

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018

Angelo Gale
983/N

**PROTEOLITIČKA AKTIVNOST
ODABRANIH SOJEVA
BAKTERIJA MLIJEČNE
KISELINE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Probiotici i starter kulture - površinski proteini i bakteriocini“ (IP-2014- 09-7009), pod mentorstvom dr. sc. Blaženke Kos, red. prof., Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te uz pomoć asistentice Katarine Butorac, mag. ing. biotechn.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof.dr.sc. Blaženki Kos na iskazanom povjerenju, susretljivosti i vodstvu tijekom izrade ovog rada. Isto tako, veliko hvala asistentici Katarini Butorac, mag. ing. biotehnologije na pristupačnosti i ustupljenim materijalima. Hvala svim mojim prijateljicama i prijateljima što su bili uz mene tijekom studiranja. Najveće hvala mojoj obitelji i zaručnici Nikolini na bezuvjetnoj podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

PROTEOLITIČKA AKTIVNOST ODABRANIH SOJEVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Angelo Gale, 983/N

Sažetak: Bakterije mliječne kiseline (BMK) su široko rasprostranjeni mikroorganizmi, te se uobičajeno nalaze u mlijeku i mliječnim proizvodima. Proteolitički sustav BMK važan je za njihov rast u mlijeku, omogućava hidrolizu kazeina te daje doprinos razvoju organoleptičkih svojstava fermentiranih mliječnih proizvoda. Cilj ovog rada je istražiti proteolitičku aktivnost sojeva BMK: *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus fermentum* D12, *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10. Primjenom API 50 CHL medija identificirani su izolirani sojevi bakterija iz roda *Lactobacillus* i srodnih rodova. AFLP metodom identificiran je autohtoni soj *Lactococcus lactis* ZG7-10, koji je prema rezultatima dobivenim Ansonovom metodom određivanja proteolitičke aktivnosti imao najveću proteolitičku aktivnost od svih ispitivanih sojeva BMK. Utvrđeno je također kako spomenuti soj proizvodi najveću koncentraciju mliječne kiseline (g L^{-1}), te najbolje raste u prisutnosti 2,0 , 4,0 i 6,5 % (w/v) NaCl-a. Tricine-SDS-PAGE elektroforezom praćena je hidroliza kazeina u obranom mlijeku kao rezultat proteolitičke aktivnosti odabranih sojeva BMK.

Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline, proteolitička aktivnost, hidroliza kazeina

Rad sadrži: 45 stranica, 11 slika, 10 tablica, 29 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Prof. dr. sc. Blaženka Kos

Pomoć pri izradi: asistentica Katarina Butorac, mag. ing. biotechn.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Jagoda Šušković
2. Prof.dr.sc. Blaženka Kos
3. Prof. dr. sc. Jadranka Frece
4. Prof. dr. sc. Ksenija Markov (zamjena)

Datum obrane: 28. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Culture Technologies

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

PROTEOLYTIC ACTIVITY OF SELECTED STRAINS OF LACTIC ACID BACTERIA

Angelo Gale, 983/N

Abstract: *Lactic acid bacteria (LAB) are widespread microorganisms and are commonly found in milk and dairy products. Proteolytic system of LAB is important for their growth in milk, enables casein hydrolysis and contributes to the development of organoleptic properties of fermented dairy products. The aim of this paper is to investigate the proteolytic activity of LAB strains: Lactobacillus brevis D6, Lactobacillus fermentum D12, Lactobacillus plantarum D13 and Lactococcus lactis ZG7-10. Using the API 50 CHL media, isolated strains of bacteria from the genus Lactobacillus and related genera were identified. An autochthonous strain of Lactococcus lactis ZG7-10 was identified by the AFLP method, which according to the results obtained by the Anson method of determining the proteolytic activity had the highest proteolytic activity of all examined LAB strains. It was also found that mentioned strain produces the highest concentration of lactic acid (g L^{-1}), and best grows in the presence of 2,0 , 4,0 and 6,5 % (w/v) NaCl. Casein hydrolysis was monitored by Tricine-SDS-PAGE electrophoresis in skimmed milk as a result of proteolytic activity of selected LAB strains.*

Keywords: *lactic acid bacteria, proteolytic activity, casein hydrolysis*

Thesis contains: 45 pages, 11 figures, 10 tables, 29 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD Blaženka Kos, Full professor*

Technical support and assistance: *Assistant Katarina Butorac, mag. ing. biotechn.*

Reviewers:

1. *PhD Jagoda Šušković, Full professor*
2. *PhD Blaženka Kos, Full professor*
3. *PhD Jadranka Frece, Full professor*
4. *PhD Ksenija Markov, Full professor (substitute)*

Thesis defended: 28 September 2018

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE I NJIHOVA ULOGA U FERMENTACIJI	2
2.1.1. Antimikrobni spojevi proizvedeni s bakterijama mliječne kiseline i njihov utjecaj na zdravlje	3
2.1.2. Proteolitički sustav bakterija mliječne kiseline	4
2.2. PRVI KORAK U PROTEOLIZI S BAKTERIJOM <i>Lactococcus lactis</i> : PROTELITIČKA AKTIVNOST PrtP PROTEINAZE	5
2.2.1. Aktivacija <i>L. lactis</i> proteinaze	9
2.2.2. Specifičnost razgradnje kazeina pomoću PrtP proteinaze	10
2.3. DRUGI KORAK U PROTEOLIZI: UNOS PEPTIDA OSLOBOĐENIH PrtP PROTEINAZOM U BAKTERIJSKU STANICU	11
2.4. ZAVRŠNI KORACI U PROTEOLIZI: PEPTIDAZE PROTELITIČKOG SUSTAVA BMK	12
2.4.1. Mehanizam djelovanja peptidaza	15
2.4.2. Regulacija proteolitičkih sustava	16
2.4.3. Fiziološka uloga i tehnološki aspekti proteolitičkih sustava BMK	18
2.4.4. Genomski pristupi i enzimologija BMK	19
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1. MATERIJALI	21
3.1.1. Radni mikroorganizmi	21
3.1.2. Hranjive podloge	21
3.1.3. Kemikalije	22
3.1.4. Aparatura i pribor	24
3.2. METODE RADA	25
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama	25
3.2.2. Analiza fermentacije različitih ugljikohidrata odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline primjenom API 50 CHL medija	25
3.2.3. Ansonova metoda određivanja proteolitičke aktivnosti	26
3.2.4. Parametri fermentacije tijekom rasta u mlijeku, rast u prisutnosti 2,0 , 4,0 i 6,5 % (w/v) NaCl-a	28
3.2.5. Analiza hidrolize kazeina Tricine–SDS–PAGE metodom	29

3.2.6. Provjera identifikacije <i>Lactococcus</i> soja sa proteolitičkom aktivnošću primjenom AFLP (eng. Amplified Fragment Length Polymorphism) metode u ovlaštenom nezavisnom laboratoriju za identifikaciju mikroorganizama (BCCM)	29
3.2.7. Izolacija kromosomske DNA	30
3.2.8. Detekcija prisutnosti gena koji kodiraju za proteinaze primjenom PCR metode sa specifičnim početnicama	30
4. REZULTATI.....	32
4.1. FIZIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA SOJEVA BMK S PROTEOLITIČKOM AKTIVNOŠĆU	32
4.1.1. Analiza fermentacije različitih ugljikohidrata odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline primjenom API 50 CHL medija.....	32
4.1.2. Ansonova metoda određivanja proteolitičke aktivnosti	34
4.1.3. Parametri fermentacije tijekom rasta u mlijeku, rast u prisutnosti 2,0 , 4,0 i 6,5 % (w/v) NaCl-a.....	36
4.1.4. Analiza hidrolize kazeina Tricine–SDS–PAGE metodom	38
4.2. IDENTIFIKACIJA SOJA <i>Lactococcus lactis</i> I DETEKCIJA GENA KOJI KODIRAJU ZA PROTEINAZE	40
4.2.1. Provjera identifikacije <i>Lactococcus</i> soja sa proteolitičkom aktivnošću primjenom AFLP (eng. Amplified Fragment Length Polymorphism) metode u ovlaštenom nezavisnom laboratoriju za identifikaciju mikroorganizama (BCCM)	40
4.2.2. Detekcija prisutnosti gena koji kodiraju za proteinaze primjenom PCR metode sa specifičnim početnicama	41
5. ZAKLJUČCI	42
6. LITERATURA.....	43

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (dalje u tekstu: BMK) su grupe bakterija koje se nalaze na različitim mjestima u našem okruženju. Mogu biti izolirane iz mlijeka, biljaka i životinjskih produkata, kao i s intestinalnog i reproduktivnog sustava čovjeka (Kok i sur., 2011). Prisutnost BMK u fermentaciji mlijeka može biti spontana ili su inokulirane kao starter kulture. Mlijeko samo po sebi je prirodni rezervoar BMK (Delavenne i sur., 2012; Wouters i sur., 2002). Proizvodnja mliječne kiseline s BMK važna je kao konzervans i kao nositelj arome za krajnje proizvode. Stoga su glavni razlozi fermentacijske prakse pomoću BMK poboljšati okus mlijeka i mliječnih proizvoda, kao i kvalitetu mlijeka povećanjem dostupnosti proteina i vitamina (Gemechu, 2015). Proteolitički sustav BMK važan je za rast mikroorganizama i uključuje hidrolizu kazeina te daje doprinos razvoju organoleptičkih svojstava fermentiranih mliječnih proizvoda (Moulay i sur., 2013). Najvažnija svojstva BMK su njihova sposobnost zakiseljavanja mlijeka i stvaranja okusa i teksture hidrolizom proteina mlijeka zbog njihovih proteolitičkih aktivnosti (Mäyrä i Bigret, 2004). Bez sumnje, najvažnija primjena BMK je njihova uporaba kao starter sojeva u proizvodnji raznih fermentiranih mliječnih proizvoda (Savijoki i sur., 2006). Zbog navedenih razloga, cilj ovog rada je istražiti kompleksan proteolitički sustav bakterija mliječne kiseline, osobito na primjeru *Lactococcus lactis*, u svrhu svrstavanja istih u tehnološko-industrijske procese, konkretno u proizvodnju sira s probiotičkim sojevima. Ispitivani sojevi u eksperimentalnom djelu rada su *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus fermentum* D12, *Lactobacillus plantarum* D13, *Lactococcus lactis* ZG7-10, te je proučavana njihova proteolitička aktivnost, kao i sposobnost proizvodnje mliječne kiseline i tolerancija prema visokim koncentracijama natrijeva klorida.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE I NJIHOVA ULOGA U FERMENTACIJI

Bakterije mliječne kiseline predstavljaju skupinu Gram-pozitivnih, asporogenih, katalaza negativnih i fakultativno anaerobnih bakterija, kuglaste ili štapičaste formacije, koje proizvode mliječnu kiselinu kao glavni krajnji produkt fermentacije ugljikohidrata. Uključuje vrste roda *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* i *Leuconostoc* (Gemechu, 2015; Panesar 2011). BMK su široko rasprostranjene u prirodi i mogu se grubo podijeliti u dvije skupine na osnovu temperature njihovog optimalnog rasta. Mezofilne BMK imaju optimalnu temperaturu rasta između 20-30 °C, a termofilne BMK optimalno rastu na temperaturi između 30-45 °C. BMK se također mogu podijeliti u dvije skupine na temelju krajnjih produkata nastalih tijekom fermentacije glukoze. Homofermentativne BMK kao što su *Pediococcus*, *Streptococcus* i *Lactococcus* proizvode mliječnu kiselinu kao jedini produkt fermentacije glukoze. Heterofermentativne BMK kao što su *Weissella* i *Leuconostoc* proizvode ekvimolarne količine laktata, CO₂ i etanola iz glukoze (Caplice i Fitzgerald, 1999; Jay, 2000; Kuipers i sur., 2000).

Koriste se širom svijeta u proizvodnji sigurne, zdrave i ukusne hrane. U takvu sirovu hranu dodaju se različite mješavine bakterija kako bi započeo proces nazvan fermentacija. To je proces gdje dolazi do povećanog rasta bakterija i lučenja njihovih produkata, prilikom čega dolazi do promjena u sastavu početnog materijala. Ako uzmemo mlijeko za primjer, tijekom fermentacijskog rasta, bakterija koristi šećer prisutan u mlijeku – laktozu, i razgrađuje ga sve do mliječne kiseline. Na ovaj način, bakterija oslobađa energiju pohranjenu u mliječnom šećeru i koristi je za rast i razmnožavanje. Mliječna kiselina koja je ovim putem proizvedena unutar bakterijske stanice, ponovno se otpušta u mlijeko. Ovisno o izboru specifičnih bakterija i korištene tehnologije (miješanje, dodavanje soli, tlačenje, izbor temperature i sl.) nastaju novi proizvodi kao što su npr. jogurt, (proizveden kombinacijom dviju različitih vrsta BMK, a to su *Lactobacillus bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*), mlaćenica (*Lactococcus lactis*) ili veliki izbor tvrdih i polutvrdih sireva (napravljenih od vrlo različitih smjesa bakterijskih sojeva *L. lactis* i *Leuconostoc mesenteroides*). Proizvodnja mliječne kiseline je vrlo važna u cijelom procesu iz razloga što povećanje kiselosti fermentiranog mlijeka otežava i/ili onemogućava rast drugim mikroorganizmima, kao što su kvasci, razni uzročnici kvarenja hrane, čak i patogene bakterije. Drugim riječima fermentirani proizvodi

(jogurt, sir) su manje kvarljivi i mogu se čuvati duži period bez pogoršanja kvalitete samog proizvoda (Kok i sur., 2011; Savijoki i sur., 2006). Poznato je da se neprerađeno mlijeko može čuvati samo nekoliko sati na sobnoj temperaturi, dok sirevi mogu imati rok trajanja do 5 godina (ovisno o vrsti). Fermentacija BMK je jeftina i učinkovita metoda očuvanja mlijeka koja dovodi do poboljšanja teksture, okusa i nutritivne vrijednosti mnogih mliječnih proizvoda, te do produljivanja roka trajanja (Gemechu, 2015). BMK, i kao najznačajniji sojevi *L. lactis*, igraju krucijalnu ulogu u procesu zrenja sira. One razgrađuju proteine koji su također prisutni u mlijeku (kao što je kazein) što je jako važno zato što su razgradni produkti proteina mlijeka nositelji arome. *L. lactis* je presudna u stvaranju prave arome prilikom zrenja sira. U teorijskom dijelu prikazan je kompleksan sustav enzima i proteina koje *L. lactis* koristi za razgradnju proteina mlijeka kako bi bili dostupni za njihov rast (Kok i sur., 2011).

2.1.1. Antimikrobni spojevi proizvedeni s bakterijama mliječne kiseline i njihov utjecaj na zdravlje

Kombinirano djelovanje antimikrobnih metabolita proizvedenih tijekom fermentacijskog procesa ima terapijsku svrhu. To uključuje organske kiseline (mliječna, octena i propionska) proizvedene kao krajnji proizvodi koji stvaraju kiselu sredinu nepovoljnu za rast mnogih patogenih mikroorganizama i uzročnika kvarenja hrane. Organske kiseline općenito pokazuju svoj antimikrobni učinak ometanjem održavanja potencijala stanične membrane, inhibiranjem aktivnog transporta, smanjenjem intracelularnog pH i inhibiranjem različitih metaboličkih funkcija (Rattanachaikunsopon i Phumkhachorn, 2010). Neki od inhibitornih spojeva za druge bakterije uključuju vodikov peroksid i bakteriocine. Oni dovode do promjene sastava crijevnih mikroorganizama, te djeluju kao sredstva protiv patogenih enteričkih bakterija sprječavajući tako dijareju. BMK također proizvode gljivične inhibicijske metabolite, uglavnom su tu već spomenute organske kiseline. Bakteriocini su peptidi koji izazivaju antimikrobno djelovanje protiv mikroorganizama zaduženih za kvarenje mlijeka i druge hrane. BMK se primjenjuju kao probiotici koji normaliziraju crijevnu mikrofloru nakon uporabe antibiotika koji narušavaju normalnu mikrofloru crijeva. Na ovaj način, fermentirana hrana se koristi za sprječavanje i ublažavanje proljeva. Osim toga, konzumacija proizvoda bogatih sojevima BMK pomaže ublažavanju konstipacije i trbušnih grčeva (Gemechu, 2015). Zbog povoljnih zdravstvenih učinaka sve je veća potražnja za fermentiranim mliječnim proizvodima. Poznato je kako fermentirani mliječni proizvodi pridonose ljudskom zdravlju kroz nekoliko mehanizama (Sharma i sur., 2012). Određeni sojevi *Lactobacillus* roda koriste

se kao promotori zdravlja, dok neki sojevi istog roda, kao što je *L. helveticus* proizvode bioaktivne peptide iz mliječnog proteina kazeina, pokazujući antihipertenzivni učinak, imunomodulaciju, antitumorski učinak i sposobnost vezanja kalcija. Vrsta *L. helveticus* je poznata kao izrazito učinkovita BMK (Gemechu, 2015). Nadalje, redovita konzumacija mlijeka i mliječnih proizvoda fermentiranih BMK potiče imunološki sustav i jača tijelo u borbi protiv bakterijskih infekcija. Tako fermentacija BMK nije samo od velikog ekonomskog značaja, već također promiče i zdravlje ljudi. Iz tih razloga potrebna je edukacija šire zajednice o prednostima konzumacije fermentiranog mlijeka i mliječnih proizvoda u svrhu promicanja zdravlja stanovništva (Gemechu, 2015).

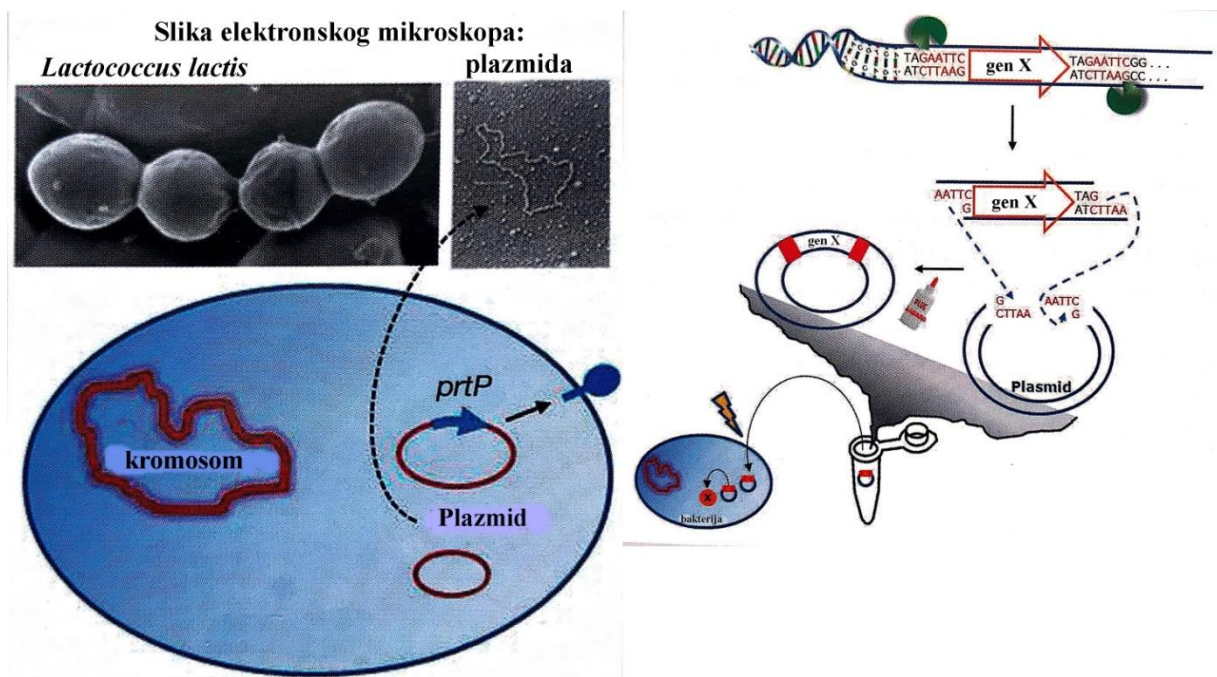
2.1.2. Proteolitički sustav bakterija mliječne kiseline

Proteolitički sustav BMK omogućava stanicama iskorištavanje esencijalnih aminokiselina tijekom rasta u mlijeku. Industrijski je značajan zbog svog doprinosa razvoju organoleptičkih svojstava fermentiranih mliječnih proizvoda (Savijoki i sur., 2006). BMK trebaju veliki broj aminokiselina koje su osigurane proteolizom kazeina, za svoj rast i dijeljenje. Aminokiseline su građevne jedinice proteina. Slično ljudima, većina BMK ne mogu sintetizirati određene aminokiseline koje nazivamo esencijalnim. Te esencijalne aminokiseline moraju pronaći u svojoj okolini i transportirati ih unutar stanice. Ovisno o specifičnosti sojeva BMK, njihovi zahtjevi mogu varirati od potrebe za 4 do čak 14 različitih aminokiselina od ukupnih 20 aminokiselina potrebnih za izgradnju proteina. Mlijeko kao takvo ne sadrži puno slobodnih aminokiselina. Ipak, mlijeko obiluje aminokiselinama koje su u sastavu kazeina. Kao svi proteini, kazein se sastoji od dugih nizova aminokiselina međusobno povezanih peptidnim vezama. Glavni proteini mlijeka su α -, β - i κ -kazein. Kako bi došla do aminokiselina, *L. lactis* ih mora osloboditi iz kazeina hidrolizom peptidnih veza. U tu svrhu bakterijska stanica proizvodi enzime proteinaze pomoću kojih hidrolizira peptidne veze u kazeinu. Tako nastaju peptidi koji su dalje hidrolizirani do slobodnih aminokiselina pomoću druge skupine enzima, nazvanih peptidazama. Bakterija *L. lactis* može koristiti te slobodne aminokiseline za sintezu vlastitih proteina različite funkcionalnosti, kao što su proteini potrebni za izgradnju staničnih struktura, za čitanje i prijenos DNA koda ili oni koji se nalaze u staničnoj ovojnici i služe za komunikaciju stanice s okolinom ili za transport važnih molekula u stanicu ili iz stanice. Proteolitička razgradnja BMK je izuzetno kompleksan sustav. U daljnjem tekstu detaljno su prikazani pojedinačni koraci u razgradnji proteina s BMK. Prvi korak tog procesa odvija se pomoću enzima proteinaze (Kok i sur., 2011).

2.2. PRVI KORAK U PROTEOLIZI S BAKTERIJOM *Lactococcus lactis*: PROTELITIČKA AKTIVNOST PrtP PROTEINAZE

Kao dio industrijskih procesa, BMK su izložene različitim stresnim uvjetima u kojima provode proteolizu. Bakterijska vrsta *Lactococcus lactis* je najopsežnije proučavana BMK i druga najispitivanija Gram-pozitivna bakterija s obzirom na genetiku, fiziologiju i molekularnu biologiju. Za *Lactococcus lactis* uspostavljen je model za proteolizu kazeina, transport, peptidolizu i metabolizamsku regulaciju (Savijoki i sur., 2006). Kazein je veliki globularni protein u čijem sastavu je više od 200 aminokiselina i kao takav je prevelik da bi ga *L. lactis* unijela u svoju stanicu. Kako bi *L. lactis* mogla iskoristiti aminokiseline kazeina, protein se cijepa u peptide dovoljno male da budu dostupni proteinazama koje su locirane na vanjskoj strani bakterijske stanice. U ranim 70.-im godinama prošloga stoljeća, istraživanja su bila fokusirana na biokemijsku karakterizaciju proteinaze, drugim riječima, koji su peptidni fragmenti formirani djelovanjem različitih proteinaza proizvedenih različitim sojevima BMK. Napretkom tehnologije genetičkog inženjerstva 1980.-ih učinjen je veliki korak u razumijevanju razgradnje proteina pomoću BMK. Ovim tehnikama omogućeno je odvojiti i pročitati/izolirati dio DNA molekule jednog organizma, u ovom slučaju BMK, i ugraditi ih u drugu bakterijsku stanicu. Izabrana bakterija za ove vrste eksperimenata bila je *Escherichia coli*, glavna modelna bakterija za kloniranje (Kok i sur., 2011).

Pomoću tehnologije genetičkog inženjerstva moguće je proučavati funkciju izolirane DNA i istražiti kako različiti geni sintetiziraju različite proteine. Prvi gen BMK kloniran ovom tehnologijom bio je gen proteinaze *L. lactis* subsp. *cremoris* Wg2. U osnovi ovog vrlo važnog prvog koraka zapaženo je kako određeni mutanti *L. lactis* soja Wg2 više nisu uspijevali rasti u mlijeku. Uspoređivanjem plazmida DNA profila tih Wg2 derivata s autohtonim sojem (tkz. „divlji tip“), bilo je jasno da je u svakom od njih uvijek nedostajao jedan specifični plazmid. Pročišćavanjem tog plazmida iz soja divljeg tipa i tretiranjem restrikcijskim enzimima (endonukleaze koje cijepaju fosfodiesterne veze u polinukleotidnom lancu) dobiveni su DNA fragmenti koji su klonirani u drugi plazmid ugrađen u soj mutant (Slika 1). Samo kada je jedan specifični DNA fragment kloniran i ponovno uveden u soj mutant, ovaj soj može ponovno rasti u mlijeku. Određene su nukleotidne sekvence specifičnog DNA fragmenta, što pokazuje da je klonirani fragment DNA sadržavao gene za proteinazu specifičnu kod laktokoka, *prtP* (Kok i sur., 2011).

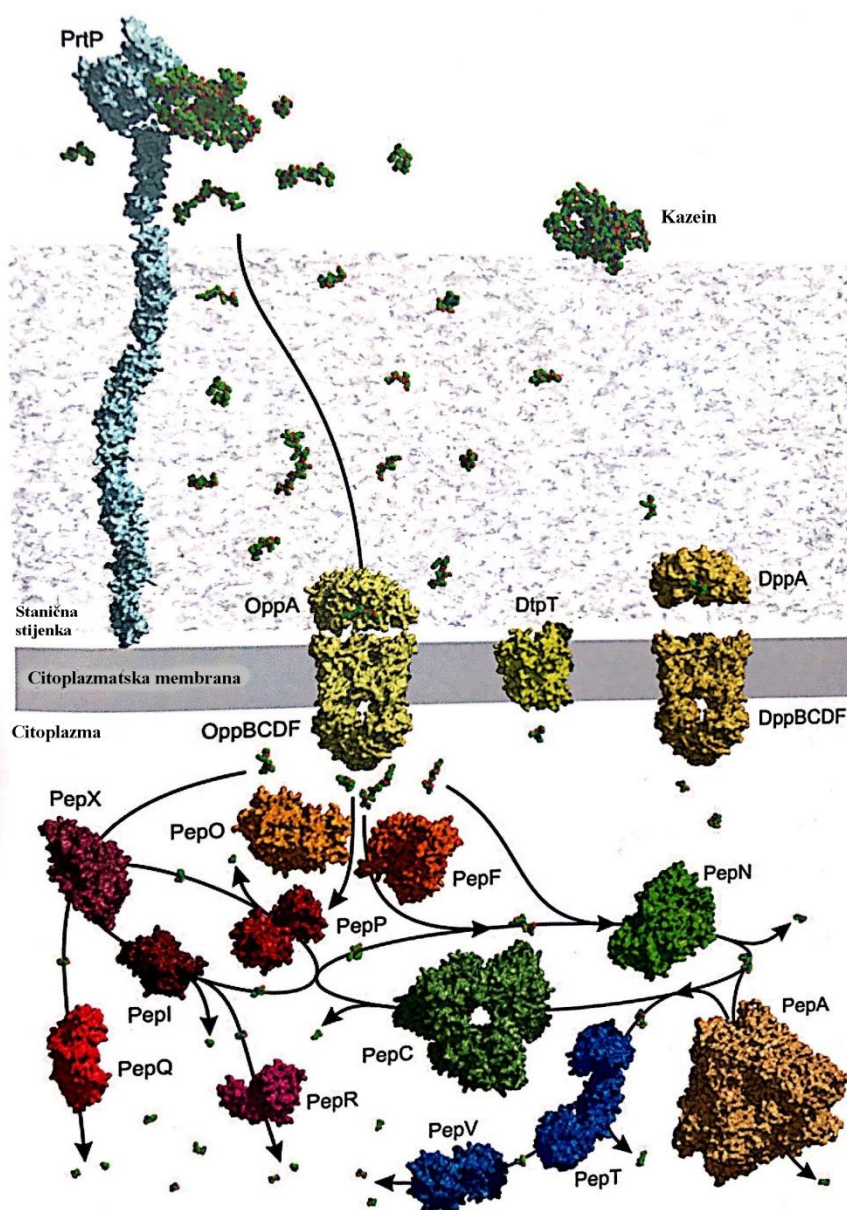


Slika 1. Detekcija *prtP* gena kod *Lactococcus lactis* (Kok i sur., 2011)

Brojni geni koji kodiraju za enzime koji sudjeluju u proteolizi s bakterijama mliječne kiseline nalaze se na plazmidima. To uključuje gen koji kodira za proteinazu (Slika 1), transportni sustav oligopeptida i različite peptidaze u određenom soju BMK. Ostali važni geni koji se nalaze na plazmidima BMK su oni koji su uključeni u razgradnju laktoze i citrata, otpornost na bakterijske viruse (bakteriofage) i proizvodnju antibakterijskih peptida (Kok i sur., 2011).

Više različitih proteinaza klonirano je i okarakterizirano iz BMK, uključujući PrtP iz *L. lactis* i *Lactobacillus paracasei*, PrtH iz *L. helveticus*, PrtR iz *Lactobacillus rhamnosus*, PrtS iz *S. thermophilus* i PrtB iz *L. bulgaricus*. BMK obično posjeduju samo jednu proteinazu, a prisutnost dviju proteinaza zabilježena je u sojevima *L. helveticus* i *L. bulgaricus* (Savijoki i sur., 2006). U ovom radu detaljno je opisana PrtP proteinaza izolirana iz *L. lactis* stanice. *L. lactis* proteinaza uspoređena je s ostalim proteinima/enzimima u svjetskoj bazi podataka proteina (SwissProt) koja sadrži aminokiselinske sekvence tisuće proteina različitih mikroorganizama, kao i viših organizama. Proteinaza specifična kod laktokoka bila je vrlo slična enzimu iz druge bakterije, proteinazi zvanog subtilizin, koju proizvodi bakterija tla – *Bacillus subtilis*. Kada su proteinaza specifična za laktokoke, PrtP i *B. subtilis* proteinaza pažljivo uspoređivane, otkriveno je da su aminokiseline aktivnog mjesta u proteinazi iz *B. subtilis* također prisutne u PrtP proteinazi iz *L. lactis*, tj. aktivna mjesta na enzimu izgledaju vrlo slično. Jasna razlika u usporedbi s proteinazom *B. subtilis* je ta da je *L. lactis* proteinaza puno veći protein koji sadrži više od 1900 aminokiselina. Usporedbe radi, *Bacillus* proteinaza

se sastoji od 275 aminokiselina. Druga razlika postoji u činjenici da, iako su oba enzima ekstracelularna, proteinaza iz *B. subtilis* završava u okolini organizma dok je proteinaza iz *L. lactis* pričvršćena na vanjsku stranu bakterijske stanice. Enzim *L. lactis* na svom terminalnom kraju sadrži sekvencu aminokiselina kojom je povezan s peptidoglikanom stanične stijenke, glavnom komponentom stanične stijenke koja pruža zaštitnu barijeru prema vanjskom svijetu. Ako se ta sekvenca PrtP proteinaze ukloni metodama genetičkog inženjerstva, derivat PrtP se neće vezati na vanjskoj strani stanične stijenke nego će, slično proteinazi iz *B. subtilis*, biti izlučen slobodno unutar organizma (Kok i sur., 2011). Na slici 2. prikazan je proteolitički sustav bakterije *L. lactis* i PrtP proteinaza vezana na staničnu stijenku.



Slika 2. Proteolitički sustav bakterije *L. lactis* (Kok i sur., 2011)

PrtP proteinaza hidrolizira kazein u oligopeptide. Ova aktivnost opisana je na sljedeći način i sljedećim oznakama:

- $X_n\downarrow X_n$ (gdje X predstavlja aminokiselinu, praćenu naznakom broja (n) aminokiselina, nakon čega slijedi (\downarrow) mjesto gdje PrtP cijepa peptidne veze.
- Oligopeptidni transportni sustav, koji sadrži OppA vezan na membranu, OppBC ugrađen u membranu i ATP-hidrolizirajući OppDF, glavni je put za peptide u stanici.
- Di-/tripeptidni transporter DtpT i di-/tripeptidni transportni sustav, koji se sastoji od DppA vezanog na membranu, DppBC ugrađenog u membranu i ATP-hidrolizirajućeg DppDF, prenosi male peptide u stanicu i služe uglavnom kao regulatorna jedinica.

U unutrašnjosti stanice – citoplazmi, niz peptidaza hidrolizira peptide do aminokiselina: - Peptidi su cijepani endopeptidazama PepO ($X_n\downarrow X_n$) i PepF ($X_n\downarrow X_n$).

- Aminokiseline se uklanjaju s N-terminalnog kraja aminopeptidazama PepN ($X\downarrow X_n$) i PepC ($X\downarrow X_n$), dok se tri- i dipeptidi razgrađuju preko tripeptidaze PepT ($X\downarrow X_2$) i dipeptidaze PepV ($X\downarrow X$).

Peptidi izvedeni iz kazeina sadrže veliku količinu aminokiseline prolin (P) i nekoliko specijaliziranih peptidaza hidrolizira oligopeptide koji sadrže prolin, kao što su aminopeptidaza PepP ($X\downarrow PX_n$), X-prolin-dipeptidil-aminopeptidaza i prolin iminopeptidaza PepI ($P\downarrow X_n$). Dipeptidi koji sadrže prolin razgrađuju se prolidazom PepO ($X\downarrow P$) i prolinazom PepR ($P\downarrow X$). Aminokiselina glutamat (E) uklanja se glutamil aminopeptidazom PepA ($E\downarrow X_n$) (Slika 2.) (Kok i sur., 2011).

Jednom kada je gen za proteinazu PrtP kloniran i sekvenciran, izgleda da soj koji nosi taj gen proizvodi više od jednog proteinaznog enzima koji se razlikuju po veličini. Ponovno uklanjanje tog gena iz stanice rezultiralo je da ova stanica izgubi sve te proteinaze. Takve su studije uvjerljivo pokazale da umjesto da istodobno proizvede mnogo različitih enzima, svaki *L. lactis* soj proizvede samo jednu proteinazu što je dosta nestabilno. Proteinaza se raspada u fragmente različitih veličina, od kojih su neki još uvijek proteolitički aktivni i još uvijek mogu razgraditi kazein. Jedno daljnje otkriće pokazalo je kako su ioni kalcija, koji su sveprisutni u mlijeku, stabilizirajući čimbenici u tom pogledu. Kada se kalcij ukloni iz otopine u kojoj se čuva proteinaza, enzim se inaktivira.

Ubrzo nakon kloniranja i analize prvog proteinskog gena iz *L. lactis*, gen za proteinazu drugog bakterijskog soja je izoliran i proučen. Ova proteinaza je imala drugačiju specifičnost i enzimi od oba bakterijska soja su se mogla uspoređivati tehnikama proteinskog inženjerstva. Zamjenom određenog dijela gena za proteinazu jednog soja s odgovarajućim dijelom gena za proteinazu drugog soja, dobivene su tkz. „kimerne“ proteinaze koje su bile sastavljene od dijelova obiju proteinaza. Različite kimerne proteinaze su pročišćene i analizirane s obzirom na sposobnost razgradnje kazeina i tako su otkriveni dijelovi proteinaze koji su uključeni u određivanje specifičnosti razgradnje proteina. Zanimljivo je da su neke kimerne proteinaze pokazale specifičnost cijepanja kazeina koja je bila potpuno nova, a koju nije pokazala ni jedna od početnih proteinaza. Dakle, ovi novi enzimi razgradili su kazein u fragmente peptida koji nisu napravljeni od izvorne dvije proteinaze. Iako to nije temeljito istraženo, implikacija ovog otkrića mogla bi biti ta da sir napravljen sa sojem *L. lactis* koji proizvodi ovu novu PrtP proteinazu bi mogao imati drugačiji okus i aromu u odnosu na sireve proizvedene sa sojevima koji produciraju izvorne proteinaze. Kao što je rečeno u uvodu, neki peptidi mogu imati jedinstvena aromatska svojstva ili djelovati kao prekursori arome i okusa (Kok i sur., 2011).

2.2.1. Aktivacija *L. lactis* proteinaze

Još jedno važno otkriće bilo je da je specifična „maturaza“ potrebna za aktiviranje *L. lactis* proteinaze (Kok i sur., 2011). U *L. lactis* stanici, *prtP* gen prethodi divergentno transkribirani gen koji kodira membranski vezani lipoprotein (PrtM) koji se pokazao esencijalnim za autokatalitičko sazrijevanje PrtP (Savijoki i sur., 2006). U početnom stadiju, PrtP se proizvodi unutar stanice kao veliki inaktivni enzim što je vrlo važno za stanicu jer aktivna proteinaza može hidrolizirati mnoge važne enzime i proteine koji se nalaze unutar stanice. Intracelularna, inaktivna PrtP proteinaza (tzv. pre-pro-proteinaza) se izlučuje van stanice i tek izvan nje postaje aktivna. Svi ekstracelularni proteini, sadrže signalnu sekvencu koja omogućuje stanici razlikovati proteine koji imaju ulogu unutar stanice i trebaju ostati tamo, od onih koji moraju biti izlučeni. Pro-regija se nalazi neposredno nakon signalne sekvence i izvan stanice se uklanja, što rezultira aktivacijom proteinaze. Pro-regija PrtP proteinaze se uklanja samo u prisutnosti maturaze, PrtM (Kok i sur., 2011).

2.2.2. Specifičnost razgradnje kazeina pomoću PrtP proteinaze

Proteinaze imaju snažan afinitet za hidrofobne kazeine, najzastupljenije proteine u mlijeku (Savijoki i sur., 2006). Pročišćena proteinaza PrtP koristi se za razgradnju kazeina kako bi se utvrdilo koji se peptidi pri tom oslobađaju. Kazein u mlijeku je mješavina triju proteina zvanih α_{S1} -, β -, i κ -kazein. Ovisno o tipu PrtP enzima samo će određeni proteini kazeina biti hidrolizirani. Tako se npr. β - i κ -kazein hidroliziraju samo u prisutnosti PI-tipa proteinaze, dok se α_{S1} -, β -, i κ -kazein razgrađuju u prisutnosti PIII-tipa proteinaze. Također postoje proteinaze s intermedijarnom specifičnošću, dok su nove (kimerne) proteinaze napravljene upotrebom tehnologije genetičkog inženjerstva. Studije koje koriste β -kazein kao supstrat otkrivaju da PI-tip proteinaze *L. lactis* preferirano hidrolizira (razgrađuje) β -kazein na kraju molekule. Više od 50 % peptida koji su oslobođeni pomoću PrtP iz β -kazeina dobiveni su od krajnje regije β -kazeina, a polovica preostalih peptida potječe od otprilike sredine molekule β -kazeina (Kok i sur., 2011). Pokazalo se da PrtP *L. lactis* djeluje na autolizin, koji je potreban za odvajanje stanica i autolizu tijekom stacionarne faze rasta (Buist i sur., 1998).

Razlike u proteinaznoj specifičnosti od velikog su značaja zbog njihovih potencijalnih djelovanja na svojstva hrane. Određeni razgradni produkti kazeina, osobito peptidi koji sadrže veliku količinu prolina, od većine potrošača percipirani su kao gorki. Oslobođanje takvih peptida u siru uzrokuje okus gorčine u krajnjem proizvodu (Kok i sur., 2011). Gorčina, koja proizlazi iz akumulacije hidrofobnih peptida, tj. peptida bogatih prolinom, predstavlja ozbiljnu prijetnju za kvalitetu pri proizvodnji Gouda i Cheddar sira (Smukowski i sur., 2003). Stoga, promjena specifičnosti proteinaze može smanjiti količinu proizvedenih gorkih peptida (Kok i sur., 2011). Određene peptidaze, uključujući PepN, PepX, PepO2 i PepO3 su uključene u hidrolizu gorkih peptida. Te peptidaze stoga utječu na razvoj organoleptičke kvalitete mliječnih proizvoda (Christensen i Steele 2003).

2.3. DRUGI KORAK U PROTEOLIZI: UNOS PEPTIDA OSLOBOĐENIH PrtP PROTEINAZOM U BAKTERIJSKU STANICU

Kao što smo već prije spomenuli, sama molekula kazeina prevelika je za unos u bakterijsku stanicu, ali što je s peptidima koje je PrtP proteinaza oslobodila od kazeina? Drugi korak u iskorištenju kazeina uključuje transport peptida u stanicu oslobođenih proteinazama, djelovanjem Opp transportnog sustava (Savijoki i sur., 2006). Postoje brojni transportni sustavi za unos peptida u BMK, budući da peptidi ne prolaze slobodno kroz citoplazmatsku membranu koja okružuje bakterijsku stanicu (Slika 2). Činjenica da se kazein razgrađuje u relativno duge peptide (oligopeptide) već sugerira da *L. lactis* zahtijeva transporter za takve peptide. Zato bakterijska stanica *L. lactis* posjeduje transportni sustav koji je specifičan za oligopeptide. Geni za ovaj sustav nazvani su Opp (kratica od Oligopeptid permeaza). Opp transportni sustav prilično je veliki kompleks koji se sastoji od pet različitih proteina. Svaki od ovih proteina određen je jednim genom, tako da *opp* genski klaster (ili „operon“) sadrži pet gena, a nakon posljednjeg *opp* gena nalazi se još jedan gen koji je važan za ovu priču o proteolizi, budući da taj gen kodira za oligopeptidazu, enzim koji razgrađuje oligopeptide u manje fragmente. *Opp* operon se sastoji od *oppD*, *oppF*, *oppB*, *oppC* i *oppA* gena. Sekvenciranjem DNA molekule i određivanjem proteinskih sekvenci, može se predvidjeti funkcija svakog pojedinog proteina. Tako su npr. *OppD* i *OppF* dva ATP-vezujuća proteina, *OppD* i *OppC* dva integralna membranska proteina (što znači da su ugrađeni u citoplazmatsku membranu), dok je *OppA* oligopeptid-vezujući protein. Ovi transporteri koriste energiju pohranjenu u obliku ATP-a za prijenos oligopeptida kroz membranu od vanjske strane stanice do unutrašnjosti. Protein *OppA* je pričvršćen na staničnu membranu (Slika 2), usmjeren prema vani i služi kao protein za hvatanje peptida koje dovodi u membranski kompleks formiran od strane druga četiri proteina (Kok i sur., 2011).

Kada su *DtpT* (za di/tri-peptid Transporter) i *OppA* inaktivirani u *L. lactis* uklanjanjem gena koji kodiraju za ove transportne proteine, postalo je jasno da u ovom organizmu postoji drugi transportni sustav, nazvan *Dpp*. *Dpp* transporter se sastoji od dva peptida vezana na membranu, *DppA* i *DppP*, čija je uloga vezanje proteina, zatim od *DppBC* peptida ugrađenog u membranu i ATP-hidrolizirajućeg *DppDF* peptida (Slika 2) (Kok i sur., 2011). *Dpp* je sposoban transportirati di-, tri- i tetrapeptide koji sadrže relativno hidrofobne aminokiseline razgranatog lanca (BCAAs) i pokazuju najveći afinitet za tripeptide (Sanz i sur., 2003), dok *DtpT* ima prednost za više hidrofilne i nabijene di- i tripeptide (Hagting i sur., 1994).

Oligopeptidni transport bitan je za rast *L. lactis* u mlijeku. Pokazalo se kako je Opp sustav neophodan za rast *L. lactis* u mlijeku. Soj u kojem je Opp sustav mutiran na kromosomu, i time nije proizveden funkcionalni Opp transporter, nije mogao rasti u mlijeku čak i kada je soj nosio gen za proteinazu PrtP (Kok i sur., 2011). Studije na *L. lactis* pokazuju da su i PrtP i Opp ključni za rast u mediju koji sadrži kazeine kao jedini izvor aminokiselina, dok nedostatak DtpT nema utjecaja na stopu rasta u mlijeku (Kunji et al., 1996). Ovo nam govori kako je više esencijalnih aminokiselina, kao dio oligopeptida, ušlo u *L. lactis* preko Opp transportera umjesto preko di-/tripeptidnih transportera. Transportni sustav oligopeptida je jedini put za uvesti peptide oslobođene iz β -kazeina. Opp mutant također nam je omogućio da zaključimo dugotrajnu raspravu o tome da li postoje ili ne postoje peptidaze na vanjskoj strani *L. lactis* stanice, bilo vezane na vanjski dio stanice ili slobodne u neposrednoj blizini stanice. Generalna ideja 1980.-ih godina je bila da je kazein razgrađen vanjskom proteinazom u velike peptide, nakon čega bi ih peptidaze hidrolizirale na male peptide i aminokiseline koje bi se potom unijele u stanicu pomoću aminokiselinskih i peptidnih transportera. Unutar stanice mali peptidi bi se dalje razgrađivali pomoću peptidaza u aminokiseline, koje su potrebne za rast stanice. Međutim, činjenica da Opp mutant ne može rasti u mlijeku, čak i kada su prisutni oligopeptidi, dokazuje da pod tim okolnostima nema značajne količine aktivnosti peptidaze proizvedene izvanstanično. Kasnije, nakon uspješnog kloniranja gotovo svih peptidnih gena, osobito nakon razjašnjenja DNA sekvence cijelog kromosoma *L. lactis* bakterijske stanice, potvrđen je ovaj zaključak: sve peptidaze pokazale su nedostatak signalne sekvence (slijeda) koja je potrebna za izlučivanje proteina iz stanice. Stanice koje nemaju Opp nisu akumulirale peptide ili aminokiseline. Kada je soju nedostajalo peptidaza, a imao je funkcionalan Opp sustav, uočen je porast koncentracije peptida. Aminokiseline su pronađene unutar stanice s funkcionalnim Opp i aktivnim peptidazama. Ovi rezultati pokazuju da Opp inkorporira peptide koji se zatim hidroliziraju do aminokiselina unutarstaničnim peptidazama (Kok i sur., 2011).

2.4. ZAVRŠNI KORACI U PROTEOLIZI: PEPTIDAZE PROTEOLITIČKOG SUSTAVA BMK

Razgradni produkti kazeina nastali djelovanjem proteinaze i uvedeni u bakterijsku stanicu pomoću različitih peptidnih transportera dalje se razgrađuju u još manje peptide i slobodne aminokiseline djelovanjem unutarstaničnih peptidaza (Tablica 1).

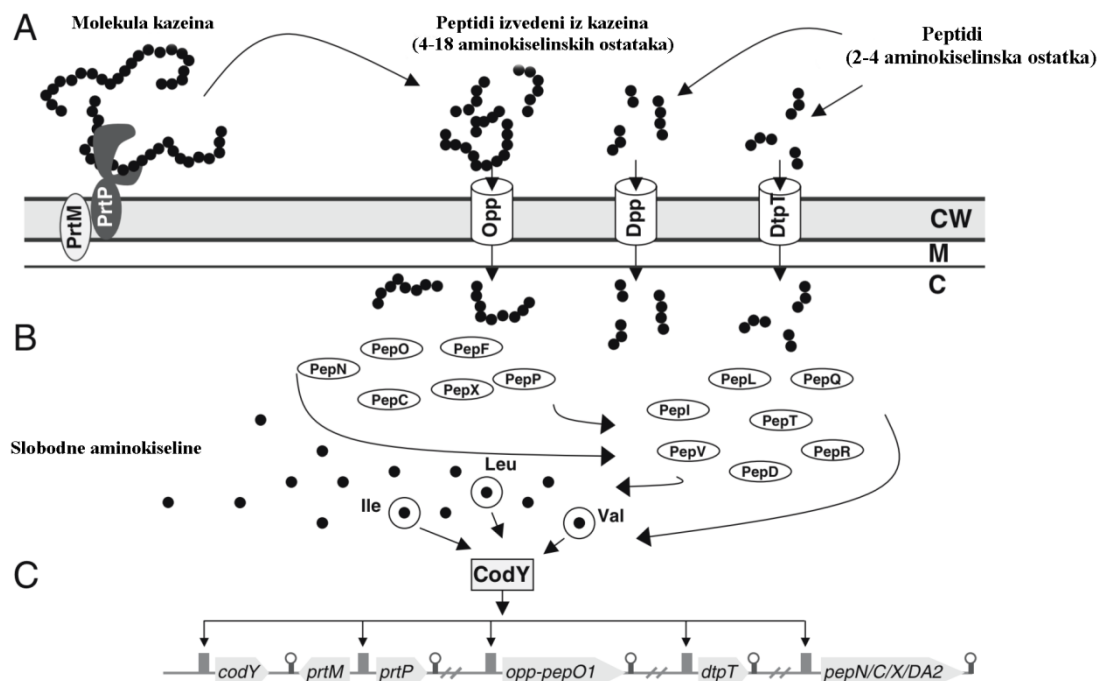
TABLICA 1. Genetički karakterizirane peptidaze BMK (Savijoki i sur., 2006)

Peptidaze	Soj BMK	Tip ^a	Specifičnost prema substratu ^b
Endopeptidaze			NH ₂ -X _n ↓X _n -COOH
PepO	<i>L. lactis</i> P8-2-47	M	
	<i>L. lactis</i> SSL135	M	
	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	M	
	<i>L. rhamnosus</i> HN001	M	
PepO2	<i>L. lactis</i> IL1403/NCDO763	M	
PepF1	<i>L. lactis</i> NCDO763	M	
PepF2	<i>L. lactis</i> IL1403/NCDO763	M	
PepO2	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	M	
PepO3	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	M	
PepE	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	C	
PepE2	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	C	
PepF	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	M	
PepG	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	C	
PepO	<i>S. thermophilus</i> A	M	
Aminopeptidaze			
PepN	<i>L. lactis</i> Wg2	M	NH ₂ -X↓X _n -COOH
	<i>L. lactis</i> MG1363	M	
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	M	
	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	M	
	<i>L. helveticus</i> 53/7	M	
	<i>S. thermophilus</i> A	M	
PepC	<i>L. lactis</i> AM2	C	NH ₂ -X↓X _n -COOH
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	C	
	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	C	
	<i>L. helveticus</i> 53/7	C	
	<i>S. thermophilus</i> A	C	
Aminopeptidaze			
PepS	<i>S. thermophilus</i> A	M	
PepA	<i>L. lactis</i> FI1876	M	NH ₂ -Glu/Asp↓X _n -COOH
PepL	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	S	
Tripeptidaze			NH ₂ -X↓X-X-COOH
PepT	<i>L. lactis</i> MG1363	M	
	<i>L. helveticus</i> 53/7	M	
Dipeptidaze			NH ₂ -X↓X-COOH
PepD	<i>L. helveticus</i> 53/7	C	
	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	C	
PepV	<i>L. lactis</i> MG1363	M	
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	M	
Prolin-specifične			
PepQ	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	M	NH ₂ -X↓Pro-COOH
	<i>L. bulgaricus</i> B14	M	
	<i>L. bulgaricus</i> CNRZ 397	M	
PepI	<i>L. bulgaricus</i> CNRZ397	S	NH ₂ -Pro↓X _n -COOH
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	S	
	<i>L. helveticus</i> 53/7	S	
PepR	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	S	NH ₂ -Pro↓X-COOH
	<i>L. helveticus</i> 53/7	S	
	<i>L. rhamnosus</i> 1/6	S	

PepX	<i>L. lactis</i> NCDO763	S	NH ₂ -X-Pro↓X _n -COOH
	<i>L. delbrueckii</i> DSM7290	S	
	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	S	
	<i>L. helveticus</i> 53/7	S	
	<i>L. rhamnosus</i> 1/6	S	
	<i>S. thermophilus</i> ACA-DC4	S	
PepP	<i>L. lactis</i>	M	NH ₂ -X↓Pro-X _n -COOH
^a Katalitička klasa peptidaze prema analizi sekvenci ili biokemijskoj karakterizaciji			
^b Strelica označava mjesto cijepanja			
<i>M</i> Metalopeptidaza, <i>C</i> cistein-peptidaza, <i>S</i> serin-peptidaza			

Peptidaze iz BMK se pročišćavaju nakon provedene lize stanica, primjenom različitih postupaka razdvajanja proteina (npr. razdvajanje proteina prema veličini, naboju itd.). Pažljivo provjeravajući koji od pročišćenih proteina je odgovoran za hidrolizu peptida, i određivanjem koji su peptidi bili razgrađeni dobiven je i kategoriziran dugi popis peptidaza (Tablica 1) (Kok i sur., 2011). Veliki broj tih enzima pročišćen je i biokemijski karakteriziran iz *S. thermophilus* i različitih sojeva *Lactococcus* i *Lactobacillus*; u većini slučajeva, odgovarajući gen je kloniran i sekvenciran. Do sada nisu pronađeni enzimi koji pripadaju grupi karboksi-peptidaza, za bilo koju BMK (Savijoki i sur., 2006).

Sekvenciranje gena nekoliko peptidaza *L. lactis* vrste i drugih vrsta BMK (najčešće iz roda *Lactobacillus*) dovelo je do zaključka da sve peptidaze zaista djeluju unutar stanice jer nisu sadržavali signalnu sekvencu koja je prisutna kod proteina/enzima koji se izlučuju izvan stanice. Upotrebom tehnika genetičkog inženjerstva u kojima se gen na bakterijskom kromosomu može specifično ukloniti, olakšalo je proučavanje uloga različitih peptidaza *L. lactis*. Svaki put kada je dobivena stanica u kojoj je uklonjena jedna ili više peptidaza, postavlja se pitanje: koje peptide ta stanica i dalje razgrađuje, a koje ne može više? Eksperimentalno bi se moglo pokazati kako nijedna peptidaza nije esencijalna za stanicu budući da svaka mutirana stanica kojoj su inaktivirani geni za proizvodnju peptidaza može rasti u mlijeku. Tako *L. lactis* stanice kojima je uklonjeno pet ili više peptidaza i dalje rastu u mlijeku, iako je rast bio nešto sporiji od roditeljskog soja, onog u kojem su sve peptidaze i dalje netaknute. Ova istraživanja pokazala su nekoliko specifičnosti peptidaza prisutnih u BMK. Peptidaze mogu razgraditi slične peptide i preuzeti uloge jedna druge kada je jedna od njih mutacijom uklonjena iz stanice (Kok i sur., 2011). Iako su uočene neke manje promjene u karakteristikama rasta, može se zaključiti da niti jedna od pojedinačnih peptidaza nije esencijalna za rast u mlijeku jer se njihove aktivnosti mogu nadomjestiti drugim peptidazama (Christensen i sur., 1999).



Slika 3. Pojednostavljeni prikaz funkcije i regulacije proteolitičkog sustava laktokoka u hidrolizi kazeina (Savijoki i sur., 2006). **A** *PrtP* proteinaza unutar stanične stijenke, *Opp* oligopeptid permeaza, *DtpT* ionom vezani transporter za di- i tripeptide i *Dpp* ABC transporter za peptide koji sadrže 2 do 9 aminokiselinskih ostataka. **B** Intracelularne peptidaze. *PepO* i *PepF* su endopeptidaze, *PepN* / *PepC* / *PepP* opće aminopeptidaze, *PepX* X-prolil dipeptidil aminopeptidaza, *PepT* tripeptidaza, *PepQ* prolidaza, *PepR* prolinaza, *PepI* prolin iminopeptidaza, i *PepD* i *PepV* dipeptidaze. **C** Transkripcijski represor CodY osjeća unutarnji bazen aminokiselina razgranatog lanca (izoleucin, leucin i valin); koristeći ove ostatke kao kofaktore CodY potiskuje ekspresiju gena uključujući proteolitički sustav u *L. lactis*.

2.4.1. Mehanizam djelovanja peptidaza

Nakon što su peptidi nastali hidrolizom kazeina uneseni u stanice BMK, dalje su hidrolizirani djelovanjem peptidaza s različitim i djelomično preklapajućim specifičnostima (Slika 3) (Kunji i sur., 1996). Intracelularne endopeptidaze, opće aminopeptidaze (*PepN* i *PepC*) i X-prolil dipeptidil aminopeptidaza (*PepX*) prvi su enzimi koji djeluju na oligopeptide. Zajednička značajka endopeptidaza je njihova nemogućnost da hidroliziraju intaktni kazein, ali hidroliziraju samo unutarnje peptidne veze peptida izvedenih iz kazeina. Druge peptidaze

sposobne djelovati na oligopeptide su metalopeptidaze, PepN i cistein peptidaze, PepC koje su okarakterizirane iz različitih BMK sojeva (Tablica 1). Zajedno, ovi enzimi hidroliziraju N-terminalne aminokiseline iz peptida, a specifičnost njihovog djelovanja ovisi o duljini peptida i svojstvima N-terminalnog aminokiselinskog ostatka (Kunji i sur., 1996). Di-/tripeptidi generirani endopeptidazama, opće aminopeptidaze i PepX slijedeći su podvrgnuti dodatnom cijepanju pomoću tripeptidaze, PepT i dipeptidaze, PepV i PepD (Tablica 1). Ovi enzimi preferiraju peptide koji sadrže hidrofobne aminokiseline uključujući leucin, metionin, fenilalanin ili glicin. Ostale peptidaze uključuju: PepA, koja oslobađa N-terminalne glutamil- i aspartil-ostatke od peptida koji su dugi od tri do devet aminokiselinskih ostataka; PepP, koja preferira tripeptide koji nose prolin u srednjem položaju; PepR i PepI, koji djeluju na dipeptide koji sadrže prolin u predzadnjem položaju; PepQ, koja cijepa dipeptide koji nose prolin u drugom položaju; i PepS, koja pokazuje preferenciju za peptide koji sadrže dva do pet aminokiselinskih ostataka s argininom ili aromatskim aminokiselinskim ostacima u N-terminalnom položaju (Tablica 1) (Kunji i sur., 1996; Savijoki i sur., 2006).

2.4.2. Regulacija proteolitičkih sustava

Sve stanice u našem tijelu sadrže iste genetičke informacije. Postavlja se pitanje, kako je onda moguće da s istom genetičkom informacijom različite stanice imaju različite funkcije u organizmu (npr. crvene krvne stanice prenose kisik i hranjive tvari, dok se srčane i mišićne stanice kontrahiraju)? Jedan od razloga je činjenica da geni nisu uvijek eksprimirani (tj. nije uvijek aktivna transkripcija i translacija kako bi genetička informacija bila prevedena u proteine/enzime). Mnogi geni u bakterijama uvijek su eksprimirani (uključeni), ali mnogi drugi su aktivni samo kada je stanici potrebno da budu. Na primjer, ako *L. lactis* raste u prisutnosti laktoze kao izvora hrane (u mlijeku), eksprimiraju se geni za iskorištavanje laktoze (npr. geni koji kodiraju transporter za unošenje laktoze i geni za enzim koji razgrađuje laktozu). Ako stanica *L. lactis* raste u prisutnosti glukoze kao izvora hrane, „glukozni geni“ će biti uključeni, dok će „laktozni geni“ biti isključeni. Na ovaj način stanica čuva energiju potrebnu za ekspresiju gena. Ukratko, svi geni koji kodiraju za glavne sudionike u proteolizi kod *L. lactis* su regularni. To uključuje gene za proteinazu, oligopeptidni i di-/tripeptidni transportni sustav i različite peptidaze. Ti geni će biti aktivni i proteini/enzimi će biti sintetizirani samo ako stanica treba aminokiseline za rast. Ovaj proces reguliran je proteinom

koji se naziva regulator. Regulator proteolitičkog sustava *L. lactis* je protein nazvan CodY koji je senzor prisutnosti triju aminokiselina razgranatog lanca: leucina, izoleucina i valina (Slika 3). CodY se može vezati na DNA samo ispred gena koje kontrolira. Vezanje CodY na DNA molekulu, onemogućava pristup enzimu koji se mora pričvrstiti za gen kako bi ga aktivirao, sprječavajući ekspresiju gena (Kok i sur., 2011). In vitro testovi pokazuju da se CodY veže na uzvodne sekvence koje prethode *opp*-operonu i da aminokiseline razgranatog lanca stimuliraju ovo vezanje (Savijoki i sur., 2006). Drugim riječima, CodY potiskuje ekspresiju gena. CodY protein ne funkcionira optimalno u reguliranju genske ekspresije u odsustvu izoleucina, leucina i valina; potrebna mu je jedna od ove tri aminokiseline za reguliranje ili suzbijanje ekspresije gena. Sustav regulacije kroz CodY protein funkcionira na slijedeći način: u stanici u kojoj je koncentracija aminokiselina niska (stanica treba aktivirati gene proteinaze, peptidaze itd.), koncentracija aminokiselina razgranatog lanca također će biti niska. Kada djelovanjem proteolitičkog sustava stanica zadovolji svoje potrebe za peptidima i aminokiselinama, stanica će također imati i visoke koncentracije triju aminokiselina razgranatog lanca koje će se vezati za CodY i zajedno će isključiti proteolitički sustav (Kok i sur., 2011). BMK će vjerojatno odgovoriti na promjene u dostupnosti dušika reguliranjem aktivnosti proteolitičkog sustava kako bi se osigurala ravnoteža dušika u stanici. Predloženo je da di-/tripeptidi s hidrofobnim ostacima djeluju kao efektorne molekule u transkripcijskoj regulaciji *Opp* sustava i time utječu na cijeli proteolitički sustav u *L. lactis* bakterijskoj stanici. Ukratko, u mediju obogaćenim dušikom, proteolitički sustav je potisnut pomoću CodY i ekspresija se smanjuje kada se stanice susreću s ograničavajućim količinama aminokiselina razgranatog lanca (Slika 3). CodY protein nije jedini regulator uključen u regulaciju proteolitičke aktivnosti u *L. lactis*. Postoje još najmanje dva regulatorna proteina, CtsR i TrmA (Savijoki i sur., 2006).

Još jedan od načina regulacije proteolitičkog sustava kod BMK vezan je za stres. Stanični odgovori na stres uključuju brzu i prolaznu indukciju proteolitičke aktivnosti kako bi se nosili s akumulacijom abnormalno presavijenih proteina uzrokovanih promjenama u uvjetima okoline. Tijekom industrijskih procesa starter bakterije uzastopno su izložene stresnim uvjetima, pa u krajnjem produktu se mogu pronaći stresni proteini startera BMK. Poznavajući da je nekoliko stresno-inducirajućih proteinaza sposobno hidrolizirati kazein *in vitro*, primamljivo je nagađati da neki od tih proteina mogu igrati ulogu u mliječnim fermentacijama kao posljedica autolize i oslobađanja tih enzima iz stanice. Važno je istaknuti da su svi ti proteini potrebni za rast *L. lactis* pri različitim stresnim uvjetima (Savijoki i sur., 2006).

2.4.3. Fiziološka uloga i tehnološki aspekti proteolitičkih sustava BMK

Proteoliza se smatra jednim od najvažnijih biokemijskih procesa koji su uključeni u proizvodnju mnogih fermentiranih mliječnih proizvoda. U proizvodnji sira, smatra se da proteoliza kazeina ima ključnu ulogu jer su aminokiseline koje proizlaze iz proteolize glavni prekursori specifičnih spojeva okusa, poput različitih alkohola, aldehida, kiselina, estera i sumpora (Smit i sur., 2005). Djelovanje proteinaza, transportnog sustava peptida i peptidaza dovodi do akumulacije aminokiselina unutar stanice, koje onda služe za sintezu proteina/enzima. Ako promatramo prosječni aminokiselinski sastav *L. lactis* stanice (postotak svake od 20 aminokiselina u svim proteinima te stanice) jasno je da postoji neravnoteža. Da se dobije dovoljno esencijalnih aminokiselina hidrolizom kazeina, stanica će također dobiti previše i drugih aminokiselina. Stanica se tog viška na neki način mora riješiti, i to čini izlučivanjem tih aminokiselina koristeći aminokiselinske transportere. Iako ovo sve zvuči prilično neekonomično, u stvari nije. Izlučivanje aminokiselina donosi energiju, koja se može koristiti za smanjenje energetske troškova unosa peptida u stanicu (Kok i sur., 2011). *In vitro* testovi se koriste za rješavanje uloge proteolitičkog sustava u oslobađanju aminokiselina iz kazeina i kazein-izvedenih peptida. Međutim, konstrukcija raznih mutiranih sojeva BMK bez jednog ili više gena omogućila je proučavanje pojedinih komponenti proteolitičkog sustava i njihovu koregulaciju u prirodnim uvjetima (Garault i sur. 2002; Christensen i Steele, 2003). Kao što je već spomenuto, aminokiseline i peptidi oslobođeni od kazeina su važne arome ili prekursori arome. Stoga je aktivnost, specifičnost i prisutnost ili odsutnost određenih peptidaza važna odrednica u formiranju arome tijekom npr. sazrijevanja sira. To objašnjava veliki znanstveni i industrijski interes za gore spomenute enzime. Još jedan vrlo bitan faktor u zrenju sira je liza *L. lactis* stanica. Pomoću lize stanični sadržaj (peptidaze) se oslobađa u siru. Te oslobođene peptidaze pronalaze bogatstvo peptida koje mogu dalje hidrolizirati pojačavajući tako aromu sira (Kok i sur., 2011). Zbog toga se, uz proteolitičke sustave, autoliza startera BMK smatra jednim važnim elementom proizvodnje sira, jer ova aktivnost dopušta oslobađanje citoplazmatskih peptidaza u sirutku, što je preduvjet za stvaranje okusa sira (Savijoki i sur., 2006). Gagnaire i sur. (2004) koristili su proteomske alate za karakterizaciju procesa zrenja sira vrste Emmentaler. Ovaj zanimljiv pristup pružio je informacije o peptidazama koje su puštene u sir od starter bakterija *L. helveticus* i *S. thermophilus* tijekom zrenja. Različite peptidaze također su nastale iz *L. helveticus* (PepN, PepO, PepE i PepQ) i *S. thermophilus* (PepN, PepX i PepS). Ovaj rad sugerirao je sudjelovanje specifičnih peptidaza *L. helveticus* i *S. thermophilus* u razgradnji peptida

izvedenih iz kazeina tijekom procesa zrenja Emmentaler sira (Gagnaire i sur., 2004). Genetskom manipulacijom proteolitičkog sustava omogućeno je postizanje željene arome sira i poželjnih nutrijenata u krajnjem proizvodu. Prekomjerna ekspresija, npr. pepN ili pepC u *L. lactis* subsp. *cremoris* NM1, pozitivno utječe na aromu Cheddar sira i povećava razinu slobodnih aminokiselina u siru (Smit i sur., 2005).

2.4.4. Genomski pristupi i enzimologija BMK

Nakon tisućljeća proizvodnje sira i desetljeća istraživanja može se reći kako je brz napredak tehnologija sekvenciranja genoma pretvorio kompiliranje podataka o sekvencama bakterijskih genoma u gotovo rutinsku znanost, a popis novih sekvenciranih BMK u javnim bazama podataka doslovno raste sa svakim mjesecom. To je omogućilo proširenje dosadašnjih spoznaja o genetici i enzimologiji BMK, te o razgradnji proteina. Pregledavanjem gena i proteina/enzima kodiranih u genomima svih sekvenciranih BMK, uočeno je da su vrste roda *Lactobacillus* posjedovale veći broj i raznolikost gena za proteinaze i peptidaze nego što je prethodno procijenjeno. Uspoređujući različite sekvence genoma, procesom nazvanim komparativna genomika, pokazalo se da su BMK evoluirale kako bi se prilagodile okolini bogatoj hranjivim tvarima (Kok i sur., 2011). Komparativna genomika otkriva neke razlike između proteolitičkih sustava BMK, na primjer, od sekvenciranih laktobacila, samo *L. sakei* i *L. johnsonii* imaju proteinaze na staničnoj ovojnici. U usporedbi s *L. lactis*, laktobacili su uglavnom manjkavi u vlastitoj biosintezi aminokiselina, što nadoknađuju sposobnošću proizvodnje velikog broja peptidaza, aminokiselinskih permeaza i višestrukih transportnih (Opp) sustava (Savijoki i sur., 2006).

Jedna od značajki koju dijele mnoge vrste BMK uključuje gubitak gena koji kodiraju enzime koji su potrebni za biosintezu različitih aminokiselina. Stanica koja je izgubila te gene, odnosno enzime, ne može sintetizirati odgovarajuće aminokiseline što znači da trebaju biti prisutne u okolišu. Aminokiseline su sada esencijalne hranjive tvari za tu stanicu. Prilagodba okolini koja sadrži male koncentracije slobodnih aminokiselina (npr. mlijeko) stoga zahtijeva zadržavanje ili stjecanje enzima kako bi se oslobodile esencijalne aminokiseline iz proteina ili peptida. Nedavna komparativna genomska analiza pokazala je da su geni mnogih enzima koji su uključeni u razgradnju proteina prisutni u svim genomima BMK koji su do sada ispitani, a izgleda kako enzimi predstavljaju dio „jezgre proteoma“ BMK (proteom je ukupni broj

staničnih proteina u određenom momentu). Neki od tih proteolitičkih enzima mogu imati funkcije „čuvara stanice“, ali najveći postotak enzima sudjeluje u razgradnji proteina tijekom rasta u složenom mediju kao što je mlijeko. Uspoređujući kromosomske sekvence BMK s drugim bakterijskim vrstama, pokazalo se da postoji nekoliko enzima koji su jedinstveni za određene vrste BMK i koji mogu predstavljati specifičnu prilagodbu BMK uvjetima okoline. Otkriće da različite vrste BMK nose slične proteolitičke gene na njihovim kromosomima, može se promatrati kao činjenica da je razgradnja proteina BMK relativno homogeni proces. Ipak, istraživanja danas jasno pokazuju da postoji široka diferencijacija u aktivnosti i specifičnosti proteolitičkih enzima iz različitih vrsta BMK, pa čak i na razini bakterijskih sojeva (Kok i sur., 2011).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

SOJEVI:

- 1) *Lactobacillus brevis* D6
- 2) *Lactobacillus fermentum* D12
- 3) *Lactobacillus plantarum* D13
- 4) *Lactococcus lactis* ZG7-10

3.1.2. Hranjive podloge

U radu je korištena hranjiva podloga za održavanje i uzgoj bakterije mliječne kiseline

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g L^{-1} destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1; $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05; natrijev-acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5 , a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 min.
- MRS bujon je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.
- GM17 agar uz dodatak glukoze, sastava (g L^{-1} destilirane vode): hidrolizat kazeina 2,5; pepton 2,5; sojin pepton 5; kvašćev ekstrakt 2,5; goveđi ekstrakt 5; natrijev glicerofosfat 19; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25; askorbinska kiselina 0,5; laktoza 5.
- GM17 bujon uz dodatak glukoze, sastava (g L^{-1} destilirane vode): hidrolizat kazeina 2,5; pepton 2,5; sojin pepton 5; kvašćev ekstrakt 2,5; goveđi ekstrakt 5; natrijev glicerofosfat 19; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25; askorbinska kiselina 0,5; laktoza 5.

3.1.3. Kemikalije

- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- Agar, „Merck“, Njemačka
- agaroz, „Appligane“, Francuska
- Akrilamid/bisakrilamid 30 % (w/v), „Sigma“, SAD
- Amonij-persulfat (30 mg/mL), „Biorad“, SAD
- API 50 CHL strip, „BioMérieux“, Francuska
- Coomassie Brilliant Blue, „Sigma“, SAD
- Destilirana voda
- EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix - (2x Premix) „Takara“, Japan
- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mannheim
- Fenolftalein
- fenol-kloroform, „Sigma“, SAD
- Fiziološka otopina
- Folin-Ciocalteu Fenol reagens „Merck“, Njemačka
- Fosfatni pufer (pH=7,4)
- Glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- Glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska
- Kazein, „Sigma-Aldrich“, Njemačka
- Klorovodična kiselina, „Sigma-Aldrich“, SAD
- kompleksal III (etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol-dihidrat), „Kemika“, Hrvatska
- Kvašcev ekstrakt, „Difco“, SAD
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- L-tirozin, „Merck“, Njemačka
- magnezijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- Mesni ekstrakt, „Bioline“, Malazija

- Mineralno ulje, „BioMérieux“, Francuska
- natrijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD
- Natrijev hidroksid, „Carlo ERBA“, Italija
- Natrijev karbonat, „Kemika“, Hrvatska
- Natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- Nuclease Free Water, „Takara“, Japan
- Obrano mlijeko, „Fluka“, Švicarska
- Octena kiseline, „J.T. Baker“, Njemačka
- početnice „Invitrogen“, SAD
- ProSieve™ Color Protein Marker, „Lonza“, SAD
- Pufer za nanošenje uzoraka za Tricine–SDS–PAGE, “Sigma-Aldrich“, SAD
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- TEMED, „Biorad“, SAD
- Tricine, „Fischer Scientific“, SAD
- Trikloroctena kiselina, „Thermo Fischer Scientific“ SAD
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba“, Italija
- Tris-baza, „Fischer Scientific“, SAD
- Tween 80, „Sigma“, SAD
- λ DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada

3.1.4. Aparatura i pribor

- Autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- Automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Bunsenov plamenik
- Centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- Čitač mikrotitarskih police LKB 5060-006, „GDV“, Italija
- Denzitometar, „BioMérieux“, Francuska
- DNA-termoblok, Mastercyclerpersonal, „Eppendorf“
- elektroforetska kadica, „BioRad“, SAD
- Eppendorf kivete
- Epruvete
- Erlenmeyerove tikvice
- Filter papir
- Hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- Kadica za SDS-PAGE, „Biorad“, SAD
- Lijevak
- Menzura
- Mikrobiološke ušice
- Petrijeve zdjelice
- Power supply, „BioRad“, SAD
- Stalci za ependorfice
- Stalci za epruvete
- Termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- transiluminator MiniBIS Pro, „DNT“, Njemačka
- Vaga, „Sartorius“, Njemačka
- Vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- Zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD

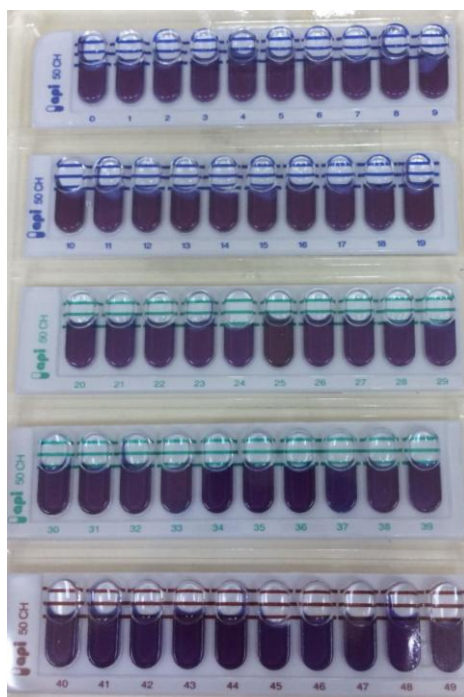
3.2. METODE RADA

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus fermentum* D12 i *Lactobacillus plantarum* D13 čuvani su pri -80 °C (New Brunswick Scientific, SAD) u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola (Alkaloid, Makedonija), dok je soj *Lactococcus lactis* ZG7-10 čuvan pri istim uvjetima u GM17 tekućoj hranjivoj podlozi. Dan prije eksperimenta sojevi su inokulirani u svježu hranjivu podlogu te inkubirani pri optimalnoj temperaturi rasta (37 °C).

3.2.2. Analiza fermentacije različitih ugljikohidrata odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline primjenom API 50 CHL medija

API 50 CHL medij namijenjen je identifikaciji bakterija iz roda *Lactobacillus* i srodnih rodova koji omogućuje fermentaciju 49 različitih ugljikohidrata na API 50 CHL stripu (BioMérieux, Francuska). Sojevi *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus fermentum* D12 i *Lactobacillus plantarum* D13 uzgojeni su anaerobno, a soj *Lactococcus lactis* ZG7-10 aerobno na odgovarajućem agaru u obliku kolonija pri 37 °C. Pomoću mikrobiološke ušice sa agra se sterilno doda biomasa u ampulu koja sadrži API 50 CHL medij. Gustoća inokuluma mjeri se u denzitometru (BioMérieux, Francuska) i podešava se na 2 McF (1 McFarland je $30 \cdot 10^7$ stanica/mL). Tako pripremljena suspenzija dodaje se u svaku ampulu, od kojih svaka na dnu sadrži jedan od 49 različitih ugljikohidrata. U sve ampule se nakon toga dodaje mineralno ulje kako bi se osigurali anaerobni uvjeti za sojeve D6, D12 i D13. Tako priređen API strip, stavlja se u termostat na inkubaciju pri optimalnoj temperaturi rasta mikroorganizma, 37 °C. Rezultati se očitavaju nakon 24 h, odnosno 48 h nakon inkubacije, te se unose u program APIWEB[®]. Ukoliko dodana bakterija fermentira određeni ugljikohidrat kao produkt njenog metabolizma nastaju kiseline (mliječna i octena kiselina), odnosno dolazi do zakiseljavanja podloge, pri čemu dolazi do promjene boje medija koji sadrži bromkrezol purpurni indikator, u žutu boju (+), a ukoliko ne fermentira ostatak će plavo-ljubičaste boje (-). Ukoliko neka ampula sadrži željezo doći će do promjene boje u crnu (+). Biokemijski profil se očita, a bakterijske kulture identificiraju pomoću programskog paketa s bazom podataka V 5.0 (prema uputama proizvođača).



Slika 4. Prikaz pripremljenog API 50 CHL stripa, napunjenog suspenzijom stanica i API 50 CHL medijem

3.2.3. Ansonova metoda određivanja proteolitičke aktivnosti

Ispitana je proteolitička aktivnost sojeva *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus fermentum* D12, *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10 u 0,65 %-tnom kazeinu (Sigma-Aldrich, Njemačka) prema Anson-ovoj metodi (Beganović i sur., 2013). Filtrat supernatanta prekonzočnih kultura svakog soja (1 mL) resuspendiran je sa 5 mL otopine kazeina, nakon čega je uslijedila inkubacija od 10 min pri 37 °C. U ovom koraku djelovanjem proteinaza dolazi do hidrolize kazeina, pri čemu dolazi do oslobađanja tirozina, ostalih aminokiselina i peptida. Reakcija je prekinuta dodatkom 5 mL trikloroctene kiseline (Thermo Fischer Scientific, SAD), pri čemu dolazi do taloženja svih proteina koji su nehidrolizirani. Nakon ponovne inkubacije (30 minuta, 37 °C) i filtracije, u 2 mL filtrata dodano je 5 mL 0.4 M otopine Na_2CO_3 (Kemika, Hrvatska) i 1 mL Folin-Ciocalteu Fenol reagensa (Merck, Njemačka). Folin-Ciocalteu Fenol reagens reagira sa slobodnim tirozinom te daje plavo obojeni kromofor, koji se kvantificira spektrofotometrijski. Uzorak je ponovno inkubiran (30 min, 37 °C) i filtriran, nakon čega je izmjerena apsorpcija na čitaču mikrotitarskih pločica LKB 5060-006 (Italija) pri 670 nm. Slijepa proba sadrži predinkubiranu otopinu kazeina kojoj

je na početku eksperimenta dodana trikloroocetna kiselina, nakon čega slijedi dodavanje supernatanta i svi prethodno opisani postupci.

S ciljem određivanja aktivnosti proteolitičkih enzima, potrebno je napraviti graf ovisnosti množine (μmol) L-tirozina (Merck, Njemačka) o apsorbanciji (A_{670}), jednadžbu pravca i koeficijent determinacije (R^2). Standardna krivulja je pripremljena mjerenjem apsorbancija (A_{670}) poznatih koncentracija L-tirozina tretiranih na isti način kao i uzorci (Tablica 2). Svi uzorci su pripremljeni u tri paralele, pri čemu je izračunata srednja vrijednost, nakon oduzimanja slijepe probe.

Priprema standardne krivulje:

Tablica 2. Prikaz potrebnih reagenasa (mL) za pripremu standardne krivulje ovisnosti množine (μmol) o apsorbanciji (A_{670})

	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5	Slijepa proba
1,1 mM L-tirozina (mL)	0,05	0,10	0,20	0,40	0,50	0
Deionizirana voda (mL)	1,95	1,90	1,80	1,60	1,50	2,00
0,4 M Na_2CO_3	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Folin fenol reagens	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UKUPNO:	8	8	8	8	8	8

Iz dobivene jednadžbe pravca, na temelju eksperimentalnih rezultata mjerenja apsorbancije (A_{670}), izračuna se množina (μmol) oslobođenog L-tirozina, uslijed hidrolize kazeina djelovanjem proteinaza, u uzorcima supernatanta korištenih sojeva. Dobivene množine uvrste se u navedenu formulu, te se izračuna aktivnost (I.J.) enzima po mL supernatanta.

$$\frac{\text{I. J.}}{\text{mL}} = \frac{n \cdot V_{\text{uk}}}{V_{\text{enz}} \cdot t \cdot V}$$

n (oslobođenog Tyr) = u μmol

V_{uk} = ukupni volumen uzorka u mL (supernatant + kazein + TCA = 11 mL)

V_{enz} = volumen korištenog enzima (u ovom slučaju supernatanta; 1 mL)

t = vrijeme enzimske reakcije u minutama (10 min)

V = volumen (u mL) korišten u kolorimetrijskom određivanju (100 μL ; 0,1 mL)

3.2.4. Parametri fermentacije tijekom rasta u mlijeku, rast u prisutnosti 2,0 , 4,0 i 6,5 % (w/v) NaCl-a

Proveden je uzgoj sojeva *L. plantarum* D13, *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12 i *L. lactis* ZG7-10 u obranom mlijeku (2 %) i u obranom mlijeku (2 %) (Sigma-Aldrich, Njemačka) uz dodatak 2,0 , 4,0 i 6,5 % (w/v) NaCl-a u svrhu provjere efikasnosti rasta pri različitim koncentracijama NaCl-a. Nakon prekonoćnog uzgoja, bakterijske stanice isprane su dva puta s fiziološkom otopinom, a uzgoj je proveden u 50 mL samo obranog mlijeka (2 %) i u 50 mL obranog mlijeka (2 %) uz dodatak različitih koncentracija NaCl-a (2,0 , 4,0 i 6,5 % (w/v)) za svaki pojedini soj. Inkubacija je provedena aerobno tijekom 48 h pri 37 °C. Tijekom uzgoja odabranih bakterijskih sojeva u obranom mlijeku i u obranom mlijeku pri različitim koncentracijama soli (NaCl-a), praćeni su parametri proizvodnje mliječne kiseline, promjene pH vrijednosti, te broj živih stanica u uzorcima indirektnom metodom, neposredno nakon inokulacije, te nakon 6, 24 i 48 sati uzgoja. Također, nakon 48 sati zabilježeno je da li je došlo do koagulacije obranog mlijeka uslijed djelovanja metabolizamske aktivnosti bakterija mliječne kiseline, odnosno proizvedenih kiselina (mliječna i octena kiselina).

Stupanj kiselosti određen je iz 1 mL uzorka supernatanta razrijeđenog s 19 mL destilirane vode u Erlenmeyerovoj tikvici od 100 mL. Razrijeđeni uzorak titriran je s 0,1 M NaOH (Carlo ERBA, Italija) uz fenolftalein kao indikator do pojave ružičaste boje. Stupanj kiselosti, odnosno postotak (%) mliječne kiseline određen je prema navedenim formulama:

$$\begin{aligned} \text{°SH} &= a \cdot 20 \cdot f_{\text{NaOH}} \cdot 2 \\ \% \text{ mliječne kiseline} &= \text{°SH} \cdot 0,0225 \end{aligned}$$

a = volumen (mL) 0,1 M NaOH

$f_{\text{NaOH}} = 1$

(°SH ~ 0,0225 g mliječne kiseline (%))

°SH → stupanj kiselosti

Broj živih stanica u uzrocima određen je indirektnom metodom tj. naciepljivanjem priređenih decimalnih razrjeđenja u Petrijevim zdjelicama s MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) hranjivom podlogom. MRS ploče s naciepljenim *Lactobacillus* vrstama inkubirane su anaerobno, dok su MRS ploče s naciepljenim *Lactococcus lactis* sojem inkubirane aerobno 24 sata pri 37 °C. Nakon inkubacije određen je broj živih bakterijskih stanica i izražen kao razlika logaritamskih vrijednosti CFU/mL obranog mlijeka od početnog broja naciepljenih stanica u 0. satu.

3.2.5. Analiza hidrolize kazeina Tricine–SDS–PAGE metodom

Prekonoćne kulture bakterijskih sojeva centrifugirane su (10 min, 4200 o/min), a zatim isprane fosfatnim puferom (pH = 7,4). Dobivena biomasa reuspendirana je u 2 %-tnoj otopini obranog mlijeka (Sigma-Aldrich, Njemačka) te inkubirana 48 sati pri 37 °C, nakon čega se pratila hidroliza kazeina koja upućuje na proteolitičku aktivnost, primjenom Tricine–SDS–PAGE metode. Kao kontrola je korištena neinkulirana otopina obranog mlijeka (2 %). Gel za Tricine–SDS–PAGE pripremljen prema Haider i sur. (2012).

3.2.6. Provjera identifikacije *Lactococcus* soja s proteolitičkom aktivnošću primjenom AFLP (eng. Amplified Fragment Length Polymorphism) metode u ovlaštenom nezavisnom laboratoriju za identifikaciju mikroorganizama (BCCM)

Provedena je identifikacija prekonoćne kulture soja ZG7-10, izolirane iz Zagrebačkog svježeg sira (Terzić-Vidojević i sur., 2015) s dokazanom proteolitičkom aktivnošću, AFLP (eng. Amplified Fragment Length Polymorphism) metodom u BCCM-u (eng. Belgian Coordinated Collections of Microorganisms).

3.2.7. Izolacija kromosomske DNA

Volumen od 1,5 mL prekonoćne kulture *Lactococcus lactis* ZG7-10 centrifugira se 10 min pri 9000 o/min i resuspendira u 1 mL GTE pufera (25 mM TRIS + 10 mM EDTA + 50 mM glukoze). Stanice se resuspendiraju u 500 µL otopine GTE pufera, lizozima (8 mg/500 µL) i RNA-ze (50 µL/mL), i inkubiraju 30 minuta pri 37 °C. Zatim se doda 250 µL SDS-a (2 %) i vorteksira 1 min. Nakon toga se doda 100 µL neutralnog fenol-kloroforma, vorteksira 30 sekundi i centrifugira pri 13 000 o/min tijekom 5 minuta. Supernatant, bez interfaze, se pomiješa s 1/10 volumena 3 M natrijeva acetata (pH = 4,8), i 1 volumenom izopropanola. Nakon inkubacije (5 minuta pri sobnoj temperaturi) slijedi centrifugiranje na 13 000 o/min tijekom 10 minuta. Talog se resuspendira u 300 µL otopine 0,3 M NaAc i 10 mM MgCl₂ te vorteksira. Nakon dodatka 700 µL apsolutnog etanola (ohlađenog na -20 °C), uzorak se inkubira preko noći pri -20 °C. Nakon toga slijedi centrifugiranje pri 14000 o/min tijekom 20 minuta. Talog se suspendira u 75 %-tnom etanolu (ohlađenom na -20 °C) i ponovno centrifugira pri 13 000 o/min tijekom 5 minuta. Talog DNA se resuspendira u 25 µL TE (10 mM Tris (pH 7,8) i 1 mM EDTA) pufera.

3.2.8. Detekcija prisutnosti gena koji kodiraju za proteinaze primjenom PCR metode sa specifičnim početnicama

Provedena je PCR (eng. Polymerase Chain Reaction) reakcija s izoliranom DNA soja *L. lactis* ZG7-10 s dokazano najboljom proteolitičkom aktivnosti. Smjesa za PCR reakciju se sastojala od EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix-a (2x Premix) (Takara, Japan), vode (Takara, Japan), uzorak DNA i početnica prtP700 (5' GCTTGAATTCGTTGTCGCTGCGGTTGT-3') i prtM700 (5'-GCATGAATTCAATGCACGATAAATGAG-3') prema Strahinić i sur. (2009) za detekciju intragenske regije prtP/prtM gena. Kao negativna kontrola za provjeru da fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije ovih dviju početnica korišten je uzorak pripravljen bez dodatka DNA. Standard se sastojao od λ DNA HindIII (Fermentas, Canada) i 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, SAD), a reakcija je provedena u uvjetima prikazanim u

Tablici 3. Nakon završene reakcije uzorci su stavljeni na agarozni gel (1 %), a elektroforeza je provedena pri 100 V. Gel je nakon završetka elektroforeze bojan u otopini etidijevog bromida koncentracije 0,5 µg/mL, nakon čega je stavljen na UV transiluminator gdje je snimljena slika gela pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

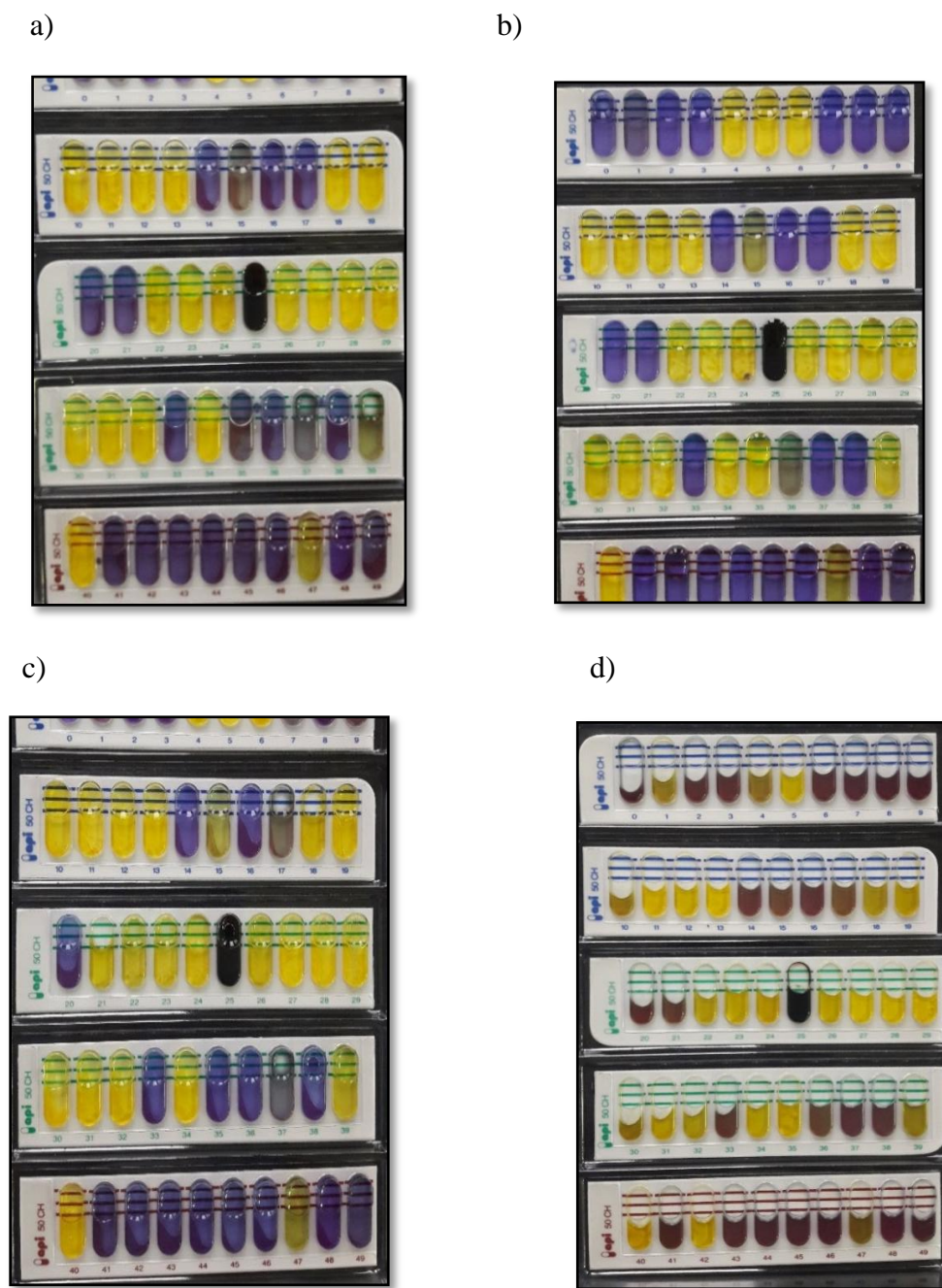
Tablica 3. Uvjeti provođenja PCR reakcije s početnicama za detekciju gena koji kodiraju za enzime uključene u proteolitičku aktivnost

Broj ponavljanja	T [°C]	Vrijeme (min)	Korak
1	94	4	inicijalna denaturacija
30	94	1	denaturacija
	56	1	sparivanje
	72	1,5	polimerizacija
1	72	7	završna elongacija

4. REZULTATI

4.1. FIZIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA SOJEVA BMK S PROTEOLITIČKOM AKTIVNOŠĆU

4.1.1. Analiza fermentacije različitih ugljikohidrata odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline primjenom API 50 CHL medija



Slika 5. Prikaz fermentacijskog profila šećera *Lactobacillus brevis* D6 (a), *L. fermentum* D12 (b), *L. plantarum* D13 (c) i *Lactococcus lactis* ZG7-10 (d) pomoću API CHL 50 testa.

Tablica 4. Fermentacijski profil bakterijskih sojeva *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *L. lactis* ZG7-10, temeljem analize provedene biokemijskim testom API 50 CHL, koji je pomoću programskog paketa uspoređen s fermentacijskih profilima bakterijskih sojeva prisutnim u bazi podataka V 5.0. te je bakterijski soj identificiran kao *Lactobacillus pentosus* (a), *Lactobacillus plantarum* ili *pentosus* (b), *L. plantarum* (c) i *L. plantarum* (d)

Ugljikohidrati		D6	D12	D13	ZG7-10
0.	Kontrola / Control	-	-	-	-
1.	Glicerol / Glycerol	-	-	-	+
2.	Eritriol / Erythriol	-	-	-	-
3.	D-arabinoza / D-arabinose	-	-	-	-
4.	L-arabinoza / L-arabinose	+	+	+	+
5.	Riboza / Ribose	+	+	+	+
6.	D-ksiloza / D-xylose	+	+	-	-
7.	L-ksiloza / L-xylose	-	-	-	-
8.	Adonitol / Adonitol	-	-	-	-
9.	β -metil-ksilozid / β -methyl-xyloside	-	-	-	-
10.	Galaktoza / Galactose	+	+	+	+
11.	D-glukoza / D-glucose	+	+	+	+
12.	D-fruktoza / D-fructose	+	+	+	+
13.	D-manoza / D-mannose	+	+	+	+
14.	L-sorboza / L-sorbose	-	-	-	-
15.	Ramnoza / Rhamnose	+	+/-	-	-
16.	Dulcitol / Dulcitol	-	-	-	-
17.	Inozitol / Inositol	+/-	-	-	-
18.	Manitol / Mannitol	+	+	+	+
19.	Sorbitol / Sorbitol	+	+	+	+
20.	α -metil-D-manozid / α -methyl-D-mannoside	-	-	-	-
21.	α -metil-D-glukozid / α -methyl-D-glucoside	+	-	-	-
22.	N-acetil glukozamin / N-acetylglucosamine	+	+	+	+
23.	Amigdalinal / Amygdalin	+	+	+	+
24.	2-keto-glukonat / 2-keto-gluconate	+	+	+	+
25.	Arbutin / Arbutin	+	+	+	+
26.	Eskulin / Esculin	+	+	+	+
27.	Salicin / Salicine	+	+	+	+
28.	Celobioza / Cellobiose	+	+	+	+
29.	Maltoza / Maltose	+	+	+	+
30.	Laktoza / Lactose	+	+	+	+
31.	Melibioza / Melibiose	+	+	+	+
32.	Saharoza/ Saccharose	+	+	+	+
33.	Trehaloza/ Trehalose	-	-	-	-
34.	Inulin / Inulin	+	+	+	+
35.	Melezitoza/ Melezitose	-	+	-	+

36.	D-rafinoza/ D-raffinose	-	+/-	-	-
37.	Amidon / Amidon	-	-	-	-
38.	Glikogen / Glycogen	-	-	-	-
39.	Ksilitol / Xylitol	+	+	+/-	+
40.	β -gentobioza/ β -gentobiose	+	+	+	+
41.	D-turanoz/ D-turanose	-	-	-	-
42.	D-liksoza / D-lyxose	-	-	-	+
43.	D-tagatoza/ D-tagatose	-	-	-	-
44.	D-fukoza / D-fucose	-	-	-	-
45.	L-fukoza / L-fucose	-	-	-	-
46.	D-arabitol / D-arabitol	-	-	-	-
47.	L-arabitol / L-arabitol	+	+/-	+	+/-
48.	Glukonat /Gluconate	-	-	-	-
49.	5-keto-glukonat /5-keto-gluconate	-	-	-	-

(-) negativna reakcija, nije došlo do promjene boje; (+) pozitivna reakcija, promjena boje u žutu u 48 sati; (\pm) promjena boje između zelene i žute.

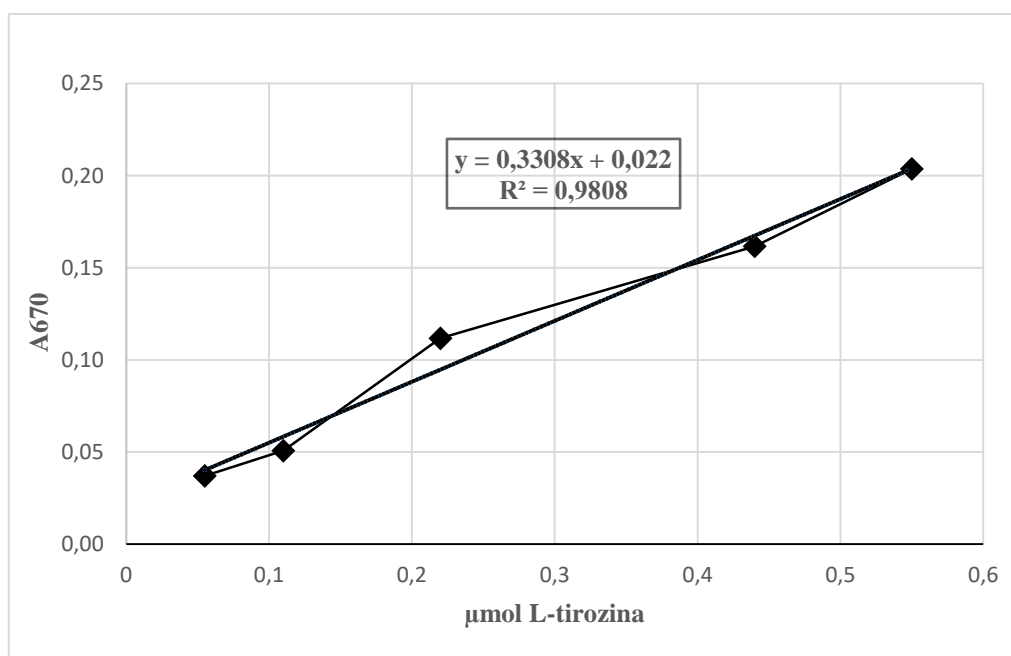
Fenotipska karakterizacija izoliranih sojeva provedena je ispitivanjem učinkovitosti fermentacije različitih izvora ugljika i to primjenom API 50 CHL testa koji služi za identifikaciju *Lactobacillus* vrsta. Na temelju eksperimentalno dobivenih profila fermentacije 49 različitih vrsta ugljikohidrata (Slika 5 i Tablica 4) i fermentacijskih profila bakterijskih sojeva prisutnih u postojećoj bazi podataka V 5.0. API sustava, provedena je identifikacija ispitivanih probiotičkih sojeva. Bakterijski soj D6 je okarakteriziran kao *L. pentosus*, soj D12 kao *L. pentosus* ili *plantarum*, a sojevi D13 i ZG7-10 također kao vrste *L. plantarum*.

4.1.2. Ansonova metoda određivanja proteolitičke aktivnosti

Proteolitička aktivnost enzima odabranih sojeva u izravnoj je korelaciji sa količinom oslobođenog tirozina uslijed hidrolize kazeina. Što je veća proteolitička aktivnost, to je više slobodnog tirozina koji reagira sa Folin-Ciocalteu Fenol reagensom što daje plavo obojeni produkt, koji se zatim kvantificira spektrofotometrijski u vidljivom dijelu spektra (A_{670}).

Tablica 5. Prikaz izračunatih množina L-tirozina i izmjerene apsorpcije (A_{670}) sa oduzetom slijepom probom, za izradu standardne krivulje za određivanje proteolitičke aktivnosti

	A_{670}	n (μmol)
<i>Standard 1</i>	0,04	0,055
<i>Standard 2</i>	0,05	0,11
<i>Standard 3</i>	0,11	0,22
<i>Standard 4</i>	0,16	0,44
<i>Standard 5</i>	0,20	0,55



Slika 6. Standardna krivulja za određivanje proteolitičke aktivnosti Ansonovom metodom

Tablica 6. Množina oslobođenog tirozina (μmol) i proteolitička aktivnost ($\text{U/mL}_{\text{supernatanta}}$) enzima prisutnih u supernatantu određena Ansonovom metodom

Soj:	n (μmol)	$\text{U/mL}_{\text{supernatanta}}$
<i>L. brevis</i> D6	0,1108	1,2193
<i>L. fermentum</i> D12	0,0720	0,7919
<i>L. plantarum</i> D13	0,0937	1,0308
<i>L. lactis</i> ZG7-10	0,3204	3,5248

4.1.3. Parametri fermentacije tijekom rasta u mlijeku, rast u prisutnosti 2,0 , 4,0 i 6,5 % (w/v) NaCl-a

Tablica 7. Praćenje promjena pH vrijednosti, proizvedene mliječne kiseline (g L^{-1}), rast bakterija mliječne kiseline izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti ($\Delta \log \text{CFU/mL}$ mlijeka) uz izračunate standardne devijacije (\pm) i sposobnost koagulacije tijekom 48 sati uzgoja u obranom mlijeku (2 %)

	Vrijeme	BAKTERIJSKI SOJEVI			
		<i>L. brevis</i> D6	<i>L. fermentum</i> D12	<i>L. plantarum</i> D13	<i>L. lactis</i> ZG7-10
pH	0. sat	6,66	6,70	6,73	6,74
	6. sat	6,57	6,51	6,64	6,45
	24. sat	6,53	5,11	5,90	5,50
	48. sat	4,81	4,11	5,37	4,79
Mliječna kiselina (g L^{-1})	0. sat	0	0	0	0
	6. sat	0	0	0	0,9
	24. sat	0	1,8	1,8	1,8
	48. sat	1,8	2,7	2,7	2,7
$\Delta \log \text{CFU/mL}$ mlijeka	0.-6. sata	0,0963 ($\pm 0,0654$)	0,0009 ($\pm 0,1154$)	0,0360 ($\pm 0,0213$)	0,2732 ($\pm 0,1995$)
	0.-24. sata	0,1436 ($\pm 0,2214$)	0,1975 ($\pm 0,0853$)	0,3894 ($\pm 0,3487$)	0,5190 ($\pm 0,0479$)
	0.-48. sata	0,6120 ($\pm 0,0457$)	0,5641 ($\pm 0,1876$)	0,0822 ($\pm 0,2968$)	0,7218 ($\pm 0,3114$)
Koagulacija (nakon 48. sati)*		++	++	+	++

*(++) jaka koagulacija; (+) slaba koagulacija; (-) nema koagulacije

Tablica 8. Praćenje promjena pH vrijednosti, proizvedene mliječne kiseline (g L^{-1}), rast bakterija mliječne kiseline izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti ($\Delta \log \text{CFU/mL}$ mlijeka) uz izračunate standardne devijacije (\pm) i sposobnost koagulacije tijekom 48 sati uzgoja u obranom mlijeku (2 %) uz dodatak NaCl-a (2 %)

	Vrijeme	BAKTERIJSKI SOJEVI			
		<i>L. brevis</i> D6	<i>L. fermentum</i> D12	<i>L. plantarum</i> D13	<i>L. lactis</i> ZG7-10
pH	0. sat	6,63	6,65	6,51	6,54
	6. sat	6,56	6,54	6,49	6,39
	24. sat	6,38	5,16	6,35	5,45
	48. sat	6,37	3,79	5,89	4,74
Mliječna kiselina (g L^{-1})	0. sat	0	0	0	0
	6. sat	0	0,9	0,9	1,35
	24. sat	0	1,8	0,9	1,8
	48. sat	0,9	2,7	1,8	2,7
$\Delta \log \text{CFU/mL}$ mlijeka	0.-6. sata	0,0178 ($\pm 0,0931$)	-0,1339 ($\pm 0,1798$)	0,1968 ($\pm 0,0579$)	0,2870 ($\pm 0,2338$)
	0.-24. sata	-0,1005 ($\pm 0,0182$)	0,4012 ($\pm 0,3013$)	0,2775 ($\pm 0,1632$)	0,3721 ($\pm 0,2687$)
	0.-48. sata	-0,6046 ($\pm 0,0578$)	0,4252 ($\pm 0,2493$)	-0,1320 ($\pm 0,2389$)	0,4078 ($\pm 0,3594$)
Koagulacija (nakon 48. sati)*		+	++	-	++

*(++) jaka koagulacija; (+) slaba koagulacija; (-) nema koagulacije

Tablica 9. Praćenje promjena pH vrijednosti, proizvedene mliječne kiseline (gL^{-1}), rast bakterija mliječne kiseline izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti ($\Delta\log \text{CFU/mL}$ mlijeka) uz izračunate standardne devijacije (\pm) i sposobnost koagulacije tijekom 48 sati uzgoja u obranom mlijeku (2 %) uz dodatak NaCl-a (4 %)

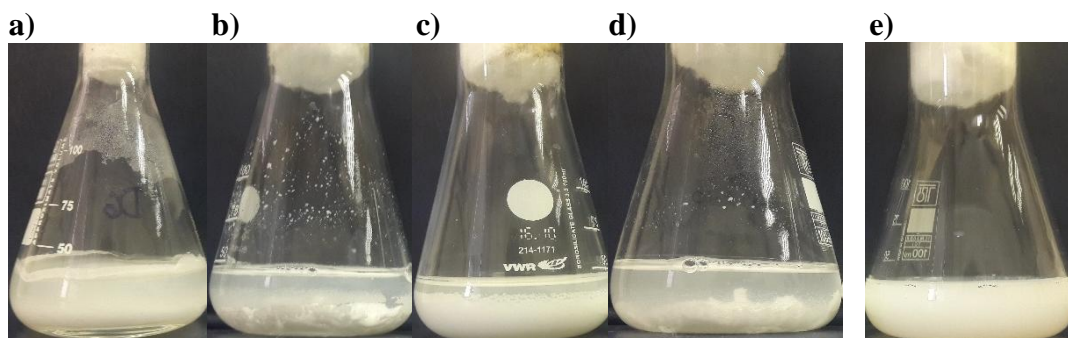
	Vrijeme	BAKTERIJSKI SOJEVI			
		<i>L. brevis</i> D6	<i>L. fermentum</i> D12	<i>L. plantarum</i> D13	<i>L. lactis</i> ZG7-10
pH	0. sat	6,64	6,60	6,62	6,64
	6. sat	6,60	6,52	6,47	6,42
	24. sat	6,39	5,53	6,24	5,82
	48. sat	6,37	4,41	5,58	5,03
Mliječna kiselina (gL^{-1})	0. sat	0	0	0	0
	6. sat	0	0	0,9	0
	24. sat	0	0,9	0,9	1,35
	48. sat	0,9	1,8	1,8	1,8
$\Delta\log \text{CFU/mL}$ mlijeka	0.-6. sata	0.0171(\pm 0.0264)	-0.0247(\pm 0.1903)	0.3093 (\pm 0.0443)	0.2033 (\pm 0.2958)
	0.-24. sata	-0.3660(\pm 0.1534)	0.2564(\pm 0.3370)	0.3264 (\pm 0.0881)	0.2776 (\pm 0.2963)
	0.-48. sata	-0.7471 (\pm 0.2406)	0.3642(\pm 0.1920)	-0.0944 (\pm 0.2500)	0.4718 (\pm 0.1756)
Koagulacija (nakon 48. sati)*		-	++	-	+

*(++) jaka koagulacija; (+) slaba koagulacija; (-) nema koagulacije

Tablica 10. Praćenje promjena pH vrijednosti, proizvedene mliječne kiseline (gL^{-1}), rast bakterija mliječne kiseline izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti ($\Delta\log \text{CFU/mL}$ mlijeka) uz izračunate standardne devijacije (\pm) i sposobnost koagulacije tijekom 48 sati uzgoja u obranom mlijeku (2 %) uz dodatak NaCl-a (6,5 %)

	Vrijeme	BAKTERIJSKI SOJEVI			
		<i>L. brevis</i> D6	<i>L. fermentum</i> D12	<i>L. plantarum</i> D13	<i>L. lactis</i> ZG7-10
pH	0. sat	6,56	6,50	6,60	6,61
	6. sat	6,55	6,45	6,38	6,41
	24. sat	6,25	5,94	6,09	5,84
	48. sat	6,23	5,18	5,87	5,52
Mliječna kiselina (gL^{-1})	0. sat	0	0	0	0
	6. sat	0	0,9	0,9	0
	24. sat	0	0,9	0,9	0,9
	48. sat	0,9	1,8	0,9	1,8
$\Delta\log \text{CFU/mL}$ mlijeka	0.-6. sata	-0,0857 (\pm 0,1029)	0,0041 (\pm 0,1387)	0,1244 (\pm 0,1192)	-0,2352 (\pm 0,1462)
	0.-24. sata	-0,1273 (\pm 0,0591)	-0,4442 (\pm 0,3201)	-0,8595 (\pm 0,2318)	0,1636 (\pm 0,2588)
	0.-48. sata	-0,8100 (\pm 0,1815)	-0,4340 (\pm 0,1836)	-0,9370 (\pm 0,0406)	-0,1530 (\pm 0,3378)
Koagulacija (nakon 48. sati)*		-	-	-	-

*(++) jaka koagulacija; (+) slaba koagulacija; (-) nema koagulacije



Slika 7. Prikaz koagulacije uslijed djelovanja proteolitičke aktivnosti odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline u obranom mlijeku (2 %) uspoređivanjem uzoraka nakon inkubacije (48 sati) pri 37 °C; *L. brevis* D6 (a), *L. fermentum* D12 (b), *L. plantarum* D13 (c), *L. lactis* ZG7-10 (d), kontrola (2 % obrano mlijeko) (e).

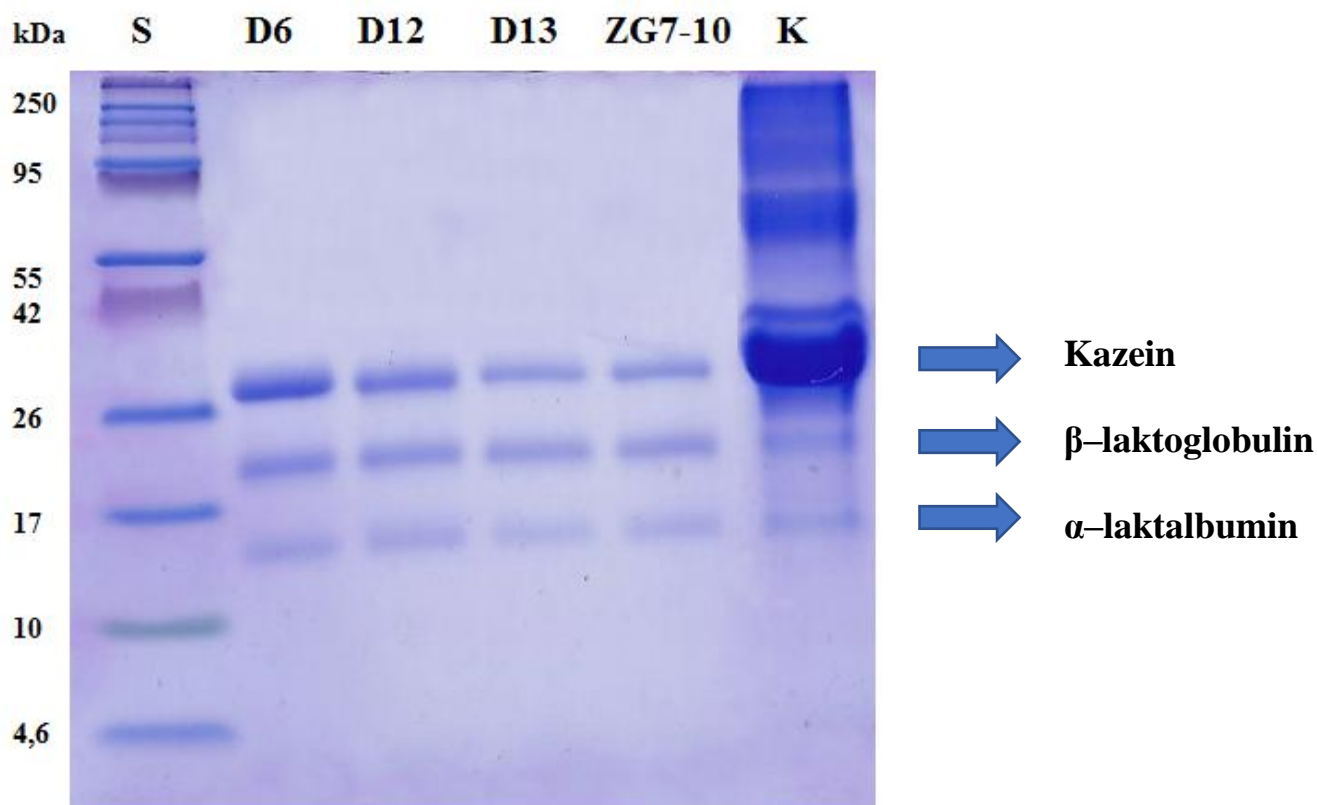
4.1.4. Analiza hidrolize kazeina Tricine–SDS–PAGE metodom

Sadržaj proteina u mlijeku je raznovrstan, s općenitom podjelom u dvije grupe. Prva grupa su kazeini kojih ima 3-4 različite vrste u mlijeku sa sličnom strukturom, a svi ostali proteini nađeni u mlijeku spadaju u drugu grupu, zajedničkim imenom nazvani sirutkini proteini (većina proteina u kravljem mlijeku su β -laktoglobulin i α -laktalbumin). Relativna veličina kazeina kod većine vrsta je između 25 i 35 kDa, dok je većina β -laktoglobulina veličine 18 kDa α -laktalbumina oko 14 kDa (Hurley, W. L., 2010).

S obzirom da je molekulska masa kazeina u mlijeku između 25 i 35 kDa, za detekciju proteolitičke aktivnosti odabranih sojeva BMK provedena je poliakrilamidna gel elektroforeza za niske molekulske mase (Tricine–SDS–PAGE).



Slika 8. Određivanje proteolitičke aktivnosti u obranom mlijeku nakon inkubacije pri 37 °C
D6 – *Lactobacillus brevis*; D12 – *Lactobacillus fermentum*; D13 – *Lactobacillus plantarum*;
ZG7-10 – *Lactococcus lactis*; K – otopina obranog mlijeka

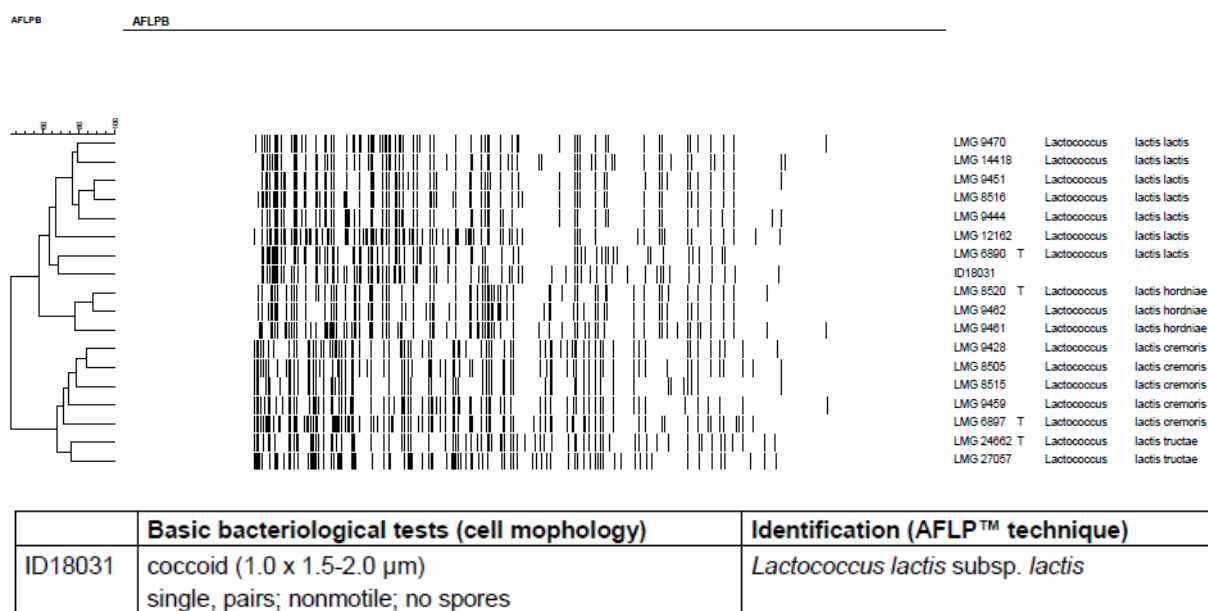


Slika 9. Utvrđivanje prisutnosti kazeina u supernatantu nakon inkubacije pomoću odabranih sojeva bakterije mliječne kiseline Tricine-SDS-PAGE elektroforezom; S – standard proteina niske molekulske mase; D6 – *Lactobacillus brevis*; D12 – *Lactobacillus fermentum*; D13 – *Lactobacillus plantarum*; ZG7-10 – *Lactococcus lactis*; K – otopina obranog mlijeka

4.2. IDENTIFIKACIJA SOJA *Lactococcus lactis* I DETEKCIJA GENA KOJI KODIRAJU ZA PROTEINAZE

4.2.1. Provjera identifikacije *Lactococcus* soja sa proteolitičkom aktivnošću primjenom AFLP (eng. Amplified Fragment Length Polymorphism) metode u ovlaštenom nezavisnom laboratoriju za identifikaciju mikroorganizama (BCCM)

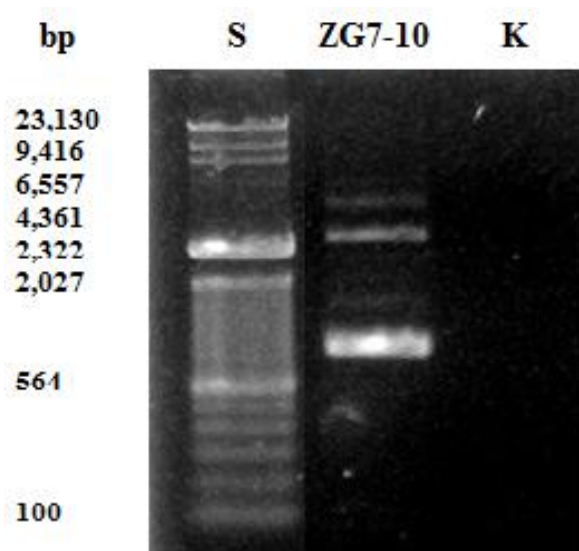
Identifikacija autohtonog soja ZG7-10 s utvrđenim morfološkim i fiziološkim karakteristikama, izoliranog iz Zagrebačkog svježeg sira (Terzić-Vidojević i sur., 2015.) provedena je AFLP metodom u BCCM-u (eng. Belgian Coordinated Collections of Microorganisms). Rezultat identifikacije soja ZG7-10 prikazan je na Slici 10. Prema dobivenim rezultatima navedeni soj pripada vrsti *L. lactis* subsp. *lactis*.



Slika 10. Rezultat identifikacije soja ZG7-10 (šifra1801) primjenom AFLP™ metode u BCCM identifikacijskom servisu

4.2.2. Detekcija prisutnosti gena koji kodiraju za proteinaze primjenom PCR metode sa specifičnim početnicama

Detekcija gena koji kodiraju za enzime koji sudjeluju u proteolitičkoj aktivnosti soja *Lactococcus lactis* ZG7-10 provedena je provođenjem PCR reakcije sa specifičnim početnicama prema Strahinić i sur. (2009). Provođenjem DNA elektroforeze u kontroli nije vidljiva vrpca, što upućuje na to da dobivena DNA vrpca kod ispitivanog soja nije produkt dimerizacije dviju upotrijebljenih početnica prtP700 i prtM700. Na gelu (Slika 11) je dobivena očekivana veličina PCR produkta veličine oko 685 bp, što ukazuje na prisutnost intragenske regije prtP/prtM gena odgovorne za ekspresiju proteinaza.



Slika 11. Elektroforeza PCR produkata u agaroznom gelu, umnoženih specifičnim prtP700 i prtM700 PCR početnicama: S – standard, ZG7-10 – *Lactococcus lactis*, K – negativna kontrola.

5. ZAKLJUČCI

1. Na temelju eksperimentalno dobivenih profila fermentacije 49 različitih vrsta ugljikohidrata pomoću API 50 CHL testa, svi ispitivani bakterijski sojevi fenotipski su okarakterizirani kao sojevi roda *Lactobacillus*.
2. Ansonovom metodom određivanja proteolitičke aktivnosti utvrđeno je kako bakterijski soj *L. lactis* ZG7-10, koji je najdetaljnije opisan u ovom radu, ima najveću proteolitičku aktivnost.
3. Bakterijski sojevi *L. lactis* ZG7-10 i *L. fermentum* D12 su proizveli najveće koncentracije mliječne kiseline i najbolje su rasli u prisutnosti 2,0 , 4,0 i 6,5 % (w/v) NaCl-a u odnosu na ostale ispitivane sojeve BMK.
4. Tricine–SDS–PAGE elektroforezom praćena je hidroliza kazeina u obranom mlijeku kao rezultat proteolitičke aktivnosti odabranih sojeva BMK.
5. Primjenom AFLP (eng. Amplified Fragment Length Polymorphism) metode u ovlaštenom nezavisnom laboratoriju za identifikaciju mikroorganizama (BCCM) identificiran je autohtoni soj ZG7-10 s utvrđenim morfološkim i fiziološkim karakteristikama, izoliran iz Zagrebačkog svježeg sira. Prema dobivenim rezultatima navedeni soj pripada vrsti *L. lactis* subsp. *lactis*.
6. PCR metodom sa specifičnim početnicama izvršena je detekcija gena prtP/prtM koji kodiraju za proteinaze soja *Lactococcus lactis* ZG7-10.

6. LITERATURA

1. Beganović, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Uroić, K., Džidara, P., Šušković, J. (2013) Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobe*, **20**, 58-64.
2. Buist, G., Venema, G., Kok, J. (1998) Autolysis of *Lactococcus lactis* is influenced by proteolysis. *J. Bacteriol.* **180**, 5947–5953.
3. Caplice, E., Fitzgerald, G. F. (1999) Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **50**, 131-149.
4. Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A., Steele, J. L. (1999) Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **76**, 217–246.
5. Christensen, J. E., Steele, J. L. (2003) Impaired growth rates in milk of *Lactobacillus helveticus* peptidase mutants can be overcome by use of amino acid supplements. *J. Bacteriol.* **185**, 3297–3306.
6. Delavenne, E., Mounier, J., Dénier, F., Barbier, G., Le Blay, G. (2012) Biodiversity of Antifungal Lactic Acid Bacteria Isolated from Raw Milk Samples from Cow, Ewe and Goat over One-Year Period. *Int. J. Food Microbiol.* **155**(3), 185-190.
7. Gagnaire, V., Piot, M., Camier, B., Vissers, J. P., Jan, G., Leonil, J. (2004) Survey of bacterial proteins released in cheese: a proteomic approach. *Int. J. Food Microbiol.* **94**, 185–201.
8. Garault, P., Le Bars, D., Besset, C., Monnet, V. (2002) Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **277**, 32–39.
9. Gemechu, T. (2015) Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. *Afr. J. Food Sci.* **9**, 170-175.
10. Hagting, A., Kunji, E., Leenhouts, K., Poolman, B., Konings, W. (1994) The di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A new type of bacterial peptide transporter. *J. Biol. Chem.* **269**, 11391–11399.
11. Haider, S. R., Helen, J. R., Sharp, B. L. (2012) Tricine-SDS-PAGE, U: Protein Electrophoresis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, (Kurien, B.T., Scofield, R.H., ured.), Springer Science+Business Media, str. 81-91.
12. Hurley, W. L. (2010) Milk Composition & Synthesis. Lactation Biology website <<http://ansci.illinois.edu/static/ansc438/>>. Pristupljeno 29. ožujka 2018.

13. Jay, J. M. (2000) Modern Food Microbiology U: Fermentation and fermented dairy products, 6. izd. An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, USA. str. 113-130.
14. Kok, J., Kunji, E. R., Steele, J. L., Broadbent, J. R. (2011) Thirty Years of Research on Lactic Acid Bacteria. U: Protein breakdown by lactic acid bacteria, (Ledeboer, A., Hugenholtz, J., Kok, J., Konings, W., Wouters, J., ured.), 24 Media Labs, Rotterdam, The Netherlands. str. 133-150.
15. Kuipers, O. P., Buist, G., Kok, J. (2000) Current strategies for improving food bacteria. *Res. Microbiol.* **151**: 815-822.
16. Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W. N. (1996) The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **70**, 187–221.
17. Leboš Pavunc A., Beganović J., Kos B., Uroić K., Blažić M., Šušković J. (2012) Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production, *Food Technol. Biotechnol.* **50** (2) 141-151.
18. Mäyrä-Mäkinen, A., Bigret, M. (2004) Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. U: Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria, (Salminen, S., von Wright A. i Ouwehand, A., ured.), Marcel Dekker, Inc., New York, str. 175-198.
19. Moulay, M., Benlancén, K., Aggad, H., Kihal, M. (2013) Diversity and Technological Properties of predominant Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian raw goat milk. *Adv. Environ. Biol.* **7**(6) 999-1007.
20. Panesar P. S. (2011) Fermented Dairy Products: Starter Cultures and Potential Nutritional Benefits. *Food Nutr. Sci.* **2**(1), 47-51.
21. Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P. (2010) Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Ann. Biol. Res.* **1**(4), 218-228.
22. Sanz, Y., Toldrá, F., Renault, P., Poolman, B. (2003) Specificity of the second binding protein of the peptide ABC-transporter (Dpp) of *Lactococcus lactis* IL1403, *FEMS Microbiol. Lett.* **227**, 33–38.
23. Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P. (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 394-406.
24. Sharma, R., Sanodiya, B. S., Bagrodia, D., Pandey, M., Sharma, A., Bisen, P. S. (2012) Efficacy and Potential of Lactic Acid Bacteria Modulating Human Health. *Int. J. Pharma Bio. Sci.* **3**(4), 935-948.

25. Smit, G., Smit, B. A., Engels, W. J. M. (2005) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 591–610.
26. Smukowski, M., Wendorff, W. L., Ping, Y., Rao, R. D. (2003) Impact of cheese defects on U.S. graded cheeses. *J. Dairy Sci.* **86**, 364.
27. Strahinić, I., Kojić, M. Tolinački, M., Fira, D., Topisirović, L. (2009) The presence of prtP proteinase gene in natural isolate *Lactobacillus plantarum* BGSJ3–1. *Appl. Microbiol.* **50**, 43-49.
28. Terzić-Vidojević, A., Tonković, K., Leboš Pavunc, A., Beganović, J., Strahinić, I., Kojić, M., Veljović, K., Golić, N., Kos, B., Čadež, N., Gregurek, LJ., Šušsković, J., Raspor, P., Topisirović, LJ. (2015) Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. *LWT - Food Sci. Technol.* **63**, 298-306.
29. Wouters, J. T. M., Ayad, E. H. E., Hugenholtz, J., Smit, G. (2002) Microbes from Raw Milk for Fermented Dairy Products. *Int. Dairy J.* **12**(2-3), 91-109.